

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Sanidad Animal



TESIS DOCTORAL

**Avances en virología de cetáceos: caracterización molecular de nuevas
secuencias de morbillivirus y herpesvirus**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Edwige Nina Bellière

Directores

**Fernando Esperón Fajardo
José Manuel Sánchez-Vizcaíno Rodríguez**

Madrid, 2013



Avances en virología de cetáceos: caracterización molecular de nuevas secuencias de morbillivirus y herpesvirus.



Stenella coeruleoalba. Manuel Arbelo - Universidad de Las Palmas de Gran Canaria

TESIS DOCTORAL

2012

Edwige Nina, Bellière.



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL

Avances en virología de cetáceos:
caracterización molecular de nuevas
secuencias de morbillivirus y herpesvirus

Edwige Nina Bellière

Madrid, Junio 2012

Esta tesis doctoral se ha desarrollado en el grupo de Epidemiología y Sanidad
Ambiental del CISA-INIA (Valdeolmos, Madrid)



Directores de tesis:

Dr. Fernando Esperón Fajardo (CISA-INIA)

Prof. Dr. José Manuel Sánchez-Vizcaíno Rodríguez (UCM)

D. Fernando Esperón Fajardo, Doctor en Veterinaria y Técnico Superior del Grupo de Epidemiología y Sanidad Ambiental del Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA-INIA), y

D. José Manuel Sánchez-Vizcaíno Rodríguez, Doctor en Veterinaria y Catedrático del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid

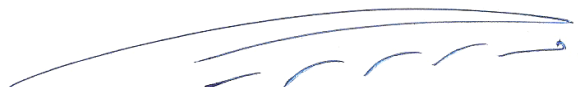
CERTIFICAN

Que **D^a Edwige Nina Bellière**, licenciada en Veterinaria, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “**AVANCES EN VIROLOGÍA DE CETÁCEOS: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE NUEVAS SECUENCIAS DE MORBILLIVIRUS Y HERPESVIRUS**”, que reúne los requisitos necesarios para ser presentado como Tesis Doctoral.

En Madrid, a 25 de Junio de 2012



Dr. Fernando Esperón Fajardo



Prof. Dr. José Manuel
Sánchez-Vizcaíno Rodríguez

Ce n'est pas parce que l'on ne sait pas tout que l'on ne sait rien

Cita tomada del libro “La vengeance de la civette masquée”, François Moutou. Le pommier (ed.), 2007.

El horizonte está a la altura de tus ojos

El texto que está a punto de leer es el fruto del trabajo que he desarrollado en el Grupo de Epidemiología y Sanidad Ambiental (EySA) del CISA-INIA durante los cuatro últimos años. A este Grupo quiero reconocer en primer lugar su apoyo incondicional a mi labor. En segundo lugar, su confianza en que esta Tesis saldría adelante, especialmente en la última y más difícil etapa. Su buen hacer diario para que el clima del trabajo sea cálido, su compañerismo, seriedad en el trabajo pero a la vez alegría que transmiten y su enorme ilusión. A las fuentes financiadoras de este Grupo que han posibilitado este trabajo: al Convenio INIA-MARM, a Tragsa, al Proyecto AGL2009-08125, al RTA2006-00168-00-00, y al AGL 2005-07947/Gan.

Mis agradecimientos van dirigidos particularmente:

A José Manuel Sánchez-Vizcaíno, mi “coach” en ésta iniciación en el mundo de la investigación, que ha sido capaz de aglutinar un grupo interinstitucional con ilusiones pero también con objetivos concretos que día a día se van consiguiendo.

A Fernando Esperón, que me ha transmitido el gusto por la fauna silvestre y, por el optimismo en el trabajo que día a día ha hecho de él una aventura tan gratificante.

Ellos dos han hecho posible que saliera a la luz éste trabajo que pretende suponer un avance en el mundo de la sanidad de los cetáceos, y más específicamente, en el estudio filogenético de sus virus más importantes. Dos temas, los mamíferos marinos y la filogenia molecular, que me gustan enormemente. Y todo ello, ¡ Desde Madrid !

Pero es para mí un placer reconocer que este trabajo ha sido posible gracias a la dedicación de mucha gente de la cual nos olvidamos muy frecuentemente. Me refiero a las personas que hacen posible que existan bancos de tejidos de animales marinos, a las personas que asisten los varamientos independientemente de si es lunes o domingo, si es mañana o noche. Me refiero también a las personas que con su esfuerzo hacen posible que estos trabajos se realicen, se financien y salgan a la luz. Y a las personas que intentan aplicar los resultados en este mundo tan necesitado.

De forma especial quiero expresar mi agradecimiento a dos grandes grupos, sin los cuales no hubiese sido posible realizar este trabajo porque han supuesto la “marine conexión”, por su calidad profesional indudable y también por sus cualidades humanas. En particular: a la unidad de la ULPGC (Universidad de Las Palmas de Gran Canarias) y sobre todo a Toño, Manolo y Eva, así como a Dani del Oceanogràfic de Valencia. Realmente ¡ Ha sido un placer colaborar con vosotros !

Dentro de mi Grupo de EySA, tengo que agradecer a mis otras “marinas”. A María Jesús Muñoz y a Matilde Carballo, cuya experiencia ofreciéndome siempre su apoyo me ha reconfortado enormemente, sobre todo cuando me sentía perdida en este amplio mundo, sus indicaciones han sido de un enorme valor a una novata como yo.

Agradecimientos

A Marisa Arias, Directora Técnica del CISA que me permitió, junto con María Jesús, dar el salto que necesitaba para poder desarrollar este trabajo sabiendo ambas lo que significaría para mí.

Obviamente, uno necesita, con aproximadamente 800 muestras a su disposición, organizar sus resultados. Allí entra Javier Iglesias del CISA-INIA, que con una paciencia extrema, me enseñó a diseñar y manejar una base de datos Access, famosa dentro de nuestro equipo porque nos permitió construir una base informativa de tejidos de cetáceos, de primera, y cuya edificación no hubiese sido posible sin él.

A Elena Neves y a Verónica Nogal que habéis sido mi apoyo diario. También a Raquel Cabrera y María José Gómez-Nieves. Todas ellas saben más que nadie lo que ha representado la realización de éste trabajo.

A mis queridos compañeros del grupo EySA, a Jaime, Irene, Ana, Miguel y Belén, por sus consejos en cada etapa del camino. Cada uno, cada día, en cada momento, habéis procurado que estuviera siempre en forma y contenta.

A las chicas “P3”: Eva, Leny, Su, Jana, Teresa, que me habéis procurado ¡tantos buenos recuerdos... !

A mi otro equipo, el equipo SUAT de la UCM: Raquel, Ana, Belén, Fer SV, Facundo, Marina, Chelo, Mar, Deborah, Almudena, Lina, Rocío, Víctor – gracias por hacer que siempre se puede contar con vosotros. Especialmente a Beatriz Martínez, por tu apoyo incondicional.

A Karnele Nuere y Soraya Messalti, habeis jugado en todo esto un gran papel.

A todos aquellos que no nombro y que fueron capaces de transmitirme su cariño y apoyo sobre todo en los momentos mas difíciles de esta etapa.

Et pour conclure,

A ma famille, pour votre soutien tout au long de ce chemin.

Pero como dicen JM y Fer: “esto no es más que el principio”. Y les contesto: “¡ Ojala !”

Otra vez muchas gracias a todos.

INDICE

RESUMEN.....	IX
SUMMARY.....	XI
LISTADO DE ABREVIATURAS.....	XIII
INTRODUCCIÓN.....	3
I LOS CETÁCEOS: GENERALIDADES	3
I.1 Filogenia y características generales de los cetáceos.....	3
I.2 Interés social y científico.....	9
II AMENAZAS	11
II.1 Amenazas en relación directa con actividades humanas	13
II.2 Contaminantes antropogénicos	13
II.3 Condiciones climáticas	14
II.4 Floraciones algales tóxicas	15
II.5 Papel de las enfermedades parasitarias e infecciosas en los varamientos.....	16
II.5.1 Agentes parasitarios.....	16
II.5.2 Agentes infecciosos bacterianos y fúngicos	17
III PAPEL DE LAS ENFERMEDADES VÍRICAS EN EL ESTADO DE SALUD DE LOS CETÁCEOS	17
III.1 Técnicas de diagnóstico empleadas en virología de cetáceos	21
III.1.1 Detección del antígeno	21
III.1.2 Detección del anticuerpo	24
III.2 Reseña de los virus de cetáceos más importantes	26
III.2.1 Familia Chordopoxviridae.....	26
III.2.2 Familia Papovaviridae	28
IV MORBILLIVIRUS DE CETÁCEO (CeMV)	30
IV.1 Etiopatogenia	30
IV.1.1 Clasificación.....	30
IV.1.2 Descripción del genoma	34
IV.1.3 Patogenia, cuadro clínico y lesiones	35
IV.1.4 Excreción del virus, transmisión y epidemiología	38
IV.2 Tipos de CeMV implicados y su localización geográfica.....	40
IV.3 Episodios de varamientos masivos de cetáceos asociados a Infección por Morbillivirus ..	42
IV.3.1 Costa este de Estados Unidos (EEUU) (1982, 1986).....	42
IV.3.2 Costa este de Estados Unidos (EEUU) (1987-1988): PMV y DMV	43
IV.3.3 Mar del Norte (1988-1990); costas de Irlanda, Inglaterra, Escocia y Holanda: PMV	43
IV.3.4 Mar Mediterráneo (1990-1993): DMV	44
IV.3.5 Golfo de Méjico (1993-1994); EEUU costas de Tejas, Misisipi, Alabama y Florida; PMV	46
IV.3.6 Mar Negro (1994).....	46
IV.3.7 Costa de California (1995-1997); PMV.....	47
IV.3.8 Mauritania (1997); ~ DMV	48
IV.3.9 Mar Mediterráneo (2006-2008); DMV	48
IV.4 Casos aislados de animales varados con Infección por Morbillivirus (IM)	50

Índice

IV.4.1	Evidencia de lesiones compatibles con IM sin caracterización molecular del morbillivirus implicado.....	50
IV.4.2	Caracterización molecular del morbillivirus implicado pero sin evidencia de enfermedad por IM..	51
IV.4.3	Evidencia de enfermedad por IM junto con caracterización molecular del morbillivirus implicado	51
IV.5	Evidencia de IM en un amplio rango de hospedadores mediante técnicas serológicas	52
V	HERPESVIRUS DE CETÁCEOS (HV)	56
V.1	Clasificación	56
V.2	Casos descritos en cetáceos	57
JUSTIFICACION Y OBJETIVOS		63
I	JUSTIFICACIÓN	63
I.1	Problemáticas “actuales”	63
I.1.1	Morbillivirus de cetáceo (CeMV).....	63
I.1.2	Hespesvirus de cetáceos (HV).....	65
I.2	Los bancos de tejidos como medio para estudiar el <i>status sanitario</i> de los cetáceos	65
II	OBJETIVOS	67
ARTICULOS CIENTIFICOS PUBLICADOS PARA ESTA TESIS		69
I	ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE UN NUEVO MORBILLIVIRUS DE CETÁCEO EN UN CALDERÓN TROPICAL VARADO EN LAS ISLAS CANARIAS	71
II	COMPARACIÓN GENÉTICA ENTRE MORBILLIVIRUS DE DELFÍN DE LOS BROTES DEL MEDITERRÁNEO DE 1990-1992 Y 2006-2008.....	77
III	PRESENCIA DE HERPESVIRUS EN DELFINES LISTADOS VARADOS DURANTE LA EPIZOOTIA DE MORBILLIVIRUS DE CETÁCEO A LO LARGO DE LA COSTA MEDITERRÁNEA ESPAÑOLA EN 2007.....	87
IV	INFECCIÓN POR HERPESVIRUS CON NECROSIS LINFOIDE GRAVE EN UN ZIFIO VARADO EN LAS ISLAS CANARIAS	93
DISCUSIÓN.....		95
I	PAPEL DE LOS CALDERONES EN LA TRANSMISIÓN DE CeMV	101
II	ORIGEN Y EVOLUCIÓN DEL DMV RESPONSABLE DEL BROTE DEL MEDITERRÁNEO EN 2006-2008....	102
III	PAPEL DE LOS HV DE CETÁCEOS EN DELFINES LISTADOS DEL MEDITERRÁNEO COMO PATÓGENOS SECUNDARIOS A CeMV	104
IV	PAPEL DE UN HV DE CETÁCEO COMO PATÓGENO PRIMARIO EN UN <i>Z. CAVIROSTRIS</i>	107
V	NUEVAS NOMENCLATURAS PROPUESTAS PARA FACILITAR LA DENOMINACIÓN DE LAS DIFERENTES SECUENCIAS TANTO DE CeMV COMO DE HV	108
V.1	CeMV	109
V.1.1	“Grupos” en vez de “cepas”	109
V.1.2	Regiones más significativas del genoma de CeMV	110
V.1.3	Regiones más significativas de los morbillivirus.....	111
V.1.4	Nueva nomenclatura para los tres grupos de cepas de CeMV	113
V.2	HV: nueva nomenclatura	115
CONCLUSIONES		117

RECOMENDACIONES	119
REFERENCIAS	121
ANEXOS	131
I GLOSARIO	I
II PROTOCOLOS DE LABORATORIO	V

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las especies de mamíferos marinos referenciadas en esta Tesis	6
Tabla 2. Virus detectados más frecuentemente en cetáceos	19
Tabla 3. Virus de cetáceos detectados de forma esporádica.....	20
Tabla 4. Listado de las especies de cetáceos en las cuales se ha detectado poxvirus.....	27
Tabla 5. Listado de las especies de cetáceos en las cuales se ha detectado papilomavirus	29
Tabla 6. Especies hospedadores de las diferentes especies de morbillivirus en condiciones naturales y experimentales	33
Tabla 7. Especies de cetáceos con serologías positivas frente a morbillivirus.....	54
Tabla 8. Listado de las secuencias nucleotídicas de alpha-HV halladas hasta 2010.....	59
Tabla 9 Listado de las secuencias nucleotídicas de gamma-HV halladas hasta 2010....	60

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación filogenética molecular de la clase <i>Mammalia</i>	3
Figura 2. Filogenia molecular de las especies de cetáceos dentro del orden <i>Cetartiodactyla</i>	4
Figura 3. Fotografía de la matanza de calderones en las islas Feroe.....	9
Figura 4. Posibles causas de varamiento de cetáceos.....	12
Figura 5. Factores necesarios al desarrollo de una enfermedad.	18
Figura 6. Esquema general del desarrollo de un ELISA directo o ELISA “SANDWICH”.....	21
Figura 7. Esquema general de la reacción de la PCR.....	23
Figura 8. Gel de lectura de RT-PCR convencional.	24
Figura 9. Esquema de desarrollo de la técnica del ELISA indirecto.....	25
Figura 10. Arbol filogenético de las diferentes especies de CeMV	31
Figura 11. Relación filogenética de MSMV con CeMV	34
Figura 12. Esquema de una partícula viral de morbillivirus.....	35
Figura 13. Encefalomiелitis no purulenta con manguitos perivasculares	37
Figura 14. Situación geográfica de los diferentes tipos de CeMV detectados y caracterizados molecularmente.....	41
Figura 15. Areas afectadas por los diferentes brotes epizoóticos en el mar Mediterráneo entre 1990 y 1992.	45
Figura 16. Mapa del escenario de Infección por Morbillivirus en el mar Mediterráneo y mar Negro entre 1990 y 1994	47
Figura 17. Esquema de una partícula viral de herpesvirus (<i>Human Herpesvirus 5</i>).	56

RESUMEN

Los cetáceos son probablemente de los mejores organismos centinelas del ecosistema marino, sin embargo, el seguimiento sanitario de estos en condiciones naturales, no resulta fácil debido a los impedimentos éticos y logísticos que existen. Por ello, el estudio de los animales varados en las costas es parte fundamental de cualquier estudio sanitario. Dentro de las enfermedades víricas, las dos fundamentales que pueden causar la muerte del animal son: la infección por el morbillivirus de cetáceo (CeMV) y por los herpesvirus (HV). El CeMV se considera el agente infeccioso más virulento para los cetáceos. Hasta la fecha hay descritos tres grupos de cepas denominadas: “morbillivirus de delfín” (dolphin morbillivirus - DMV), “morbillivirus de la marsopa” (porpoise morbillivirus - PMV), y “morbillivirus del calderón” (pilot whale morbillivirus - PWMV). En cuanto a los HV, estos pueden producir distintos cuadros clínicos que van desde problemas reproductivos o cutáneos hasta encefalitis y viremias, y que pueden ocasionar desde inmunosupresión a cuadros sistémicos; sin embargo a día de hoy, siguen existiendo escasas referencias acerca de su impacto real en la salud de los cetáceos.

Partiendo de un banco de tejidos, y con el fin de conocer el papel que el CeMV juega en el estado de salud de los cetáceos, se ha diagnosticado el virus mediante PCR seguido del estudio filogenético de las secuencias obtenidas. También se han analizado molecularmente estos mismos tejidos para detectar la presencia de HV, y valorar el efecto negativo de estos virus en las poblaciones de cetáceos. Concretamente, se han caracterizado molecularmente las siguientes cepas de CeMV: una cepa nueva de CeMV procedente de un *Globicephala machrorhynchus* varado en 1996 en el archipiélago canario y dos cepas de DMV del brote de CeMV ocurrido en el periodo 2006-2008 en las costas mediterráneas, españolas y francesas, y que afectó al menos a 60 *Globicephala melas* y 200 *Stenella coeruleoalba*. En este brote también se rató la presencia de nuevas secuencias de HV. Además se analizó una nueva cepa de HV en un *Ziphius cavirostris* varado en Canarias en 2005. Estudios previos habían descrito que en el Atlántico la infección por CeMV era endémica en los *Globicephala* sp. y que éstos podían jugar un papel importante en la transmisión de CeMV a otras especies. Sin embargo los estudios moleculares que hemos realizado en esta tesis han identificado en *G. machrorhynchus* la cepa PWMV-like, de la misma forma que otra cepa, la PWMV,

había sido anteriormente identificada en *G. melas*. Nosotros pensamos que es posible que los *Globicephala* sp. estén infectados endémicamente pero con unas cepas mejor adaptadas al hospedador. Además, la gran mortalidad en el brote de 2006-2008 acaecida en el Mediterráneo demuestra que DMV es altamente patógeno para *G. melas*. Así pues, en vez de suponer que en 2006 el DMV ha entrado desde los *G. melas* del Atlántico a los *G. melas* del Mediterráneo, y apoyándonos en uno de nuestros resultados, que demuestra que el DMV del Mediterráneo de 2006-2008 tiene su origen en el DMV del mar Mediterráneo de 1990, consideramos que el DMV podría ser endémico en las poblaciones mediterráneas de *S. coeruleoalba* y haber saltado a una nueva especie hospedadora, el *G. melas*, mediante una mutación en la proteína de fusión (de alanina, en el *S. coeruleoalba*, a valina, en el *G. melas*). Por otra parte, el rastreo molecular de HV en todos los tejidos de los individuos varados en 2007 (epizootia de DMV de 2006-2008), ha permitido hallar que cinco *S. coeruleoalba*, todos positivos a CeMV, fueron también positivos en diferentes tejidos a 8 HV (7 α -HV y 1 γ -HV). Es la primera vez que se describen secuencias de HV en *S. coeruleoalba* en todo el mundo, la primera en un cetáceo varado en el Mediterráneo, y la primera en la que se ha demostrado una coinfección entre HV y CeMV. Los HV parecen agentes secundarios en la infección por CeMV ya que los animales no presentaban lesiones compatibles con HV, pero sí con CeMV. Otros autores confirmaron en un *S. coeruleoalba* varado en las costas catalanas, una coinfección de HV-CeMV observando lesiones compatibles con ambos agentes. También en el archipiélago canario hemos descrito por primera vez una infección sistémica por HV en aguas europeas y en una especie hospedadora donde no se había descrito infección por HV hasta la fecha (*Z. cavirostris*). En esta tesis con el fin de facilitar su denominación, se propone adoptar una nomenclatura para el tercer grupo de cepas de CeMV: así CeMV-3 serían las cepas PWMV y PWMV-like; de forma similar a la que otros autores habían utilizado para denominar a las cepas del grupo PMV como CeMV-1 o a las de DMV como CeMV-2. Por otro lado, para unificar la denominación de las nuevas cepas de HV de cetáceos halladas, como se ha propuesto por otros autores recientemente, consideramos que se podrían nombrar según la familia del hospedador en el que se haya detectado.

En resumen, podemos concluir que la detección molecular de CeMV y HV nos ha permitido realizar avances significativos en la virología de cetáceos, lo que puede contribuir a la mejor interpretación de las problemáticas relacionadas con la salud de sus individuos, y por extensión a la de sus poblaciones y a la del ecosistema marino.

SUMMARY

Cetaceans are probably the best sentinel organisms in the marine ecosystem. However, monitoring the health of these creatures under natural conditions is not easy, due to ethical and logistical obstacles. Therefore, the study of the animals stranded on coasts is an essential part of any health study. Within viral diseases, the two basic diseases that can cause the animals' death are: infection by Cetacean morbillivirus (CeMV) and by herpesvirus (HV).

CeMV is considered the most virulent infectious agent for cetaceans. To date there are three clusters of strains described, which are named: dolphin morbillivirus (DMV), porpoise morbillivirus (PMV) and pilot whale morbillivirus (PWMV). With regard to the HV, these can cause different symptoms which range from reproductive or cutaneous problems to encephalitis and viremia, and may cause anything from immunosuppression to systemic symptoms. However, to date, there are still very few references on their real impact on cetacean health.

Starting with a tissue bank, and with the goal of understanding the role that CeMV plays in cetaceans' health, the virus was diagnosed using PCR followed by the phylogenetic analysis of the sequences obtained. These same tissues were subjected to molecular analysis to detect the presence of HV and evaluate the negative effect of these viruses on cetacean populations. Specifically, the following CeMV strains have been molecularly typed: a new strain of CeMV found in a *Globicephala machrorhynchus* stranded in 1996 in the Canary Islands and two DMV strains from the CeMV outbreak that occurred in the period from 2006-2008 on the Spanish and French Mediterranean coasts, which affected at least 60 *Globicephala melas* and 200 *Stenella coeruleoalba*. New HV sequences were also detected in this outbreak. Moreover, a new strain of HV was analysed in a *Ziphius cavirostris* stranded in the Canary Islands in 2005.

Previous studies had concluded that CeMV infection was endemic in *Globicephala* sp. and that they might play an important role in transmitting CeMV to other species. However, the molecular analyses performed for this thesis have identified the PWMV-like strain in *G. machrorhynchus*, just as another strain, PWMV, had previously been identified in *G. melas*. We believe that it is possible that the *Globicephala* sp. are endemically infected but by strains better adapted to the host. In addition, the major die-off in the 2006-2008 outbreak that occurred in the Mediterranean shows that DMV is highly pathogenic for *G. melas*.

Summary

Thus, instead of assuming that the DMV was transmitted from the Atlantic *G. melas* to the Mediterranean *G. melas*, based on one of our results which shows that the Mediterranean DMV of 2006-2008 originated in the Mediterranean DMV of 1990, we believe that the DMV could be endemic in Mediterranean populations of *S. coeruleoalba* and have jumped to a new host species, the *G. melas*, through a fusion protein mutation (from alanine, in *S. coeruleoalba*, to valine, in *G. melas*). On the other hand, the molecular tracking of HV in all of the individuals stranded in 2007 (epizootic of DMV in 2006-2008) made it possible to discover that five *S. coeruleoalba*, all CeMV-positive, were also positive for 8 HV in different tissues (7 α -HV and 1 γ -HV). It is the first time that HV sequences have been described in *S. coeruleoalba* anywhere in the world, the first in a cetacean stranded in the Mediterranean, and the first in which a co-infection of HV and CeMV was demonstrated. The HV viruses seem to be secondary infection agents in the CeMV infection, since the animals' lesions were not consistent with HV but rather with CeMV. Other authors confirmed an HV-CeMV co-infection in an *S. coeruleoalba* stranded on the Catalan coast, observing lesions consistent with both agents. In the Canary Islands we also documented a systemic HV infection in European waters for the first time, and in a host species where HV infections had not been described to date (*Z. cavirostris*).

In this thesis we propose adopting a nomenclature for the third cluster of CeMV strains in order to facilitate their identification. Thus, CeMV-3 would be the PWMV and PWMV-like strains, just as other authors have called the PMV group of strains "CeMV-1" or those of DMV "CeMV-2". On the other hand, in order to standardise the nomenclature of the new HV strains found in cetaceans, we believe that they could be named according to the host family they were detected in, as has been suggested by other authors recently.

In summary, we can conclude that the molecular detection of CeMV and HV has allowed us to make significant advances in cetacean virology, which can contribute to better interpretation of the problems affecting the health of individual animals and, by extension, that of the populations as a whole and the marine ecosystem.

LISTADO DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Término en inglés	Término en español
ADN		ácido desoxiribonucleico
ARN		ácido ribonucleico
CDV	Canine Distemper virus	virus del moquillo canino
CeMV	Cetacean morbillivirus	morbillivirus de cetáceo
DDTs		Dicloro Difenil Tricloroetano
DMV	dolphin morbillivirus	morbillivirus de delfín
EEUU		Estados Unidos
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay	ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
F	Fusion protein	proteína de fusión
H	Hemagglutinin protein	proteína de la hemaglutinina
HHV-1	Human Herpesvirus 1	herpes simplex humano
HV		cualquier virus de la familia <i>Herpesviridae</i>
iELISA		ELISA indirecto
IHQ		inmunohistoquímica
IM		Infección por Morbillivirus
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses	Comité internacional de Taxonomía vírica
Kb		kilobase
L	Large protein	proteína grande
M	Matrix protein	proteína de matriz
MET		Microscopía electrónica de transmisión
MeV	Measles virus	virus del sarampión humano
MSMV	monk seal morbillivirus	morbillivirus de la foca monje
N	Nucleoprotein	nucleoproteína

LISTADO DE ABREVIATURAS (cont.)

Abreviatura	Término en inglés	Término en español
P	Phosphoprotein	fosfoproteína
pb		pares de bases
PCBs		bifenilos policlorinados
PCR	Polymerase Chain Reaction	reacción en cadena de la polimerasa
PDV	Phocine Distemper virus	virus del moquillo de la foca
PMV	porpoise morbillivirus	morbillivirus de marsopa
PPRV	Peste-des-Petits-Ruminants virus	virus de la peste de los pequeños rumiantes
PWMV	pilot whale morbillivirus	morbillivirus del calderón
RNP	ribonucleoprotein complex	complejo ribonucleoproteico
RPV	Rinderpest virus	virus de la peste bovina
RT-PCR	retrotranscription - polymerase chain reaction	reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción
ss	simple strand	cadena sencilla
SSPE	subacute sclerosing panencephalitis	panencephalitis esclerosante subaguda
VN		virus neutralización

INTRODUCCIÓN



I Los cetáceos: generalidades

I.1 Filogenia y características generales de los cetáceos

Los mamíferos marinos se clasifican dentro de tres órdenes: el orden *Carnivora* (osos polares, nutrias, focas, leones marinos, morsas), el *Sirenia* (manatíes y dugongos) y el *Cetacea* (ballenas, marsopas y delfines) (Reidarson 2003). El orden *Cetacea* se ha agrupado recientemente, mediante técnicas moleculares, junto con el orden *Artiodactyla* (ungulados de pezuña plana, hipopótamo, cerdo, vaca), denominándose este orden *Cetartiodactyla* (Figura 1) (Hasegawa and Adachi, 1996; Nishihara et al., 2006).

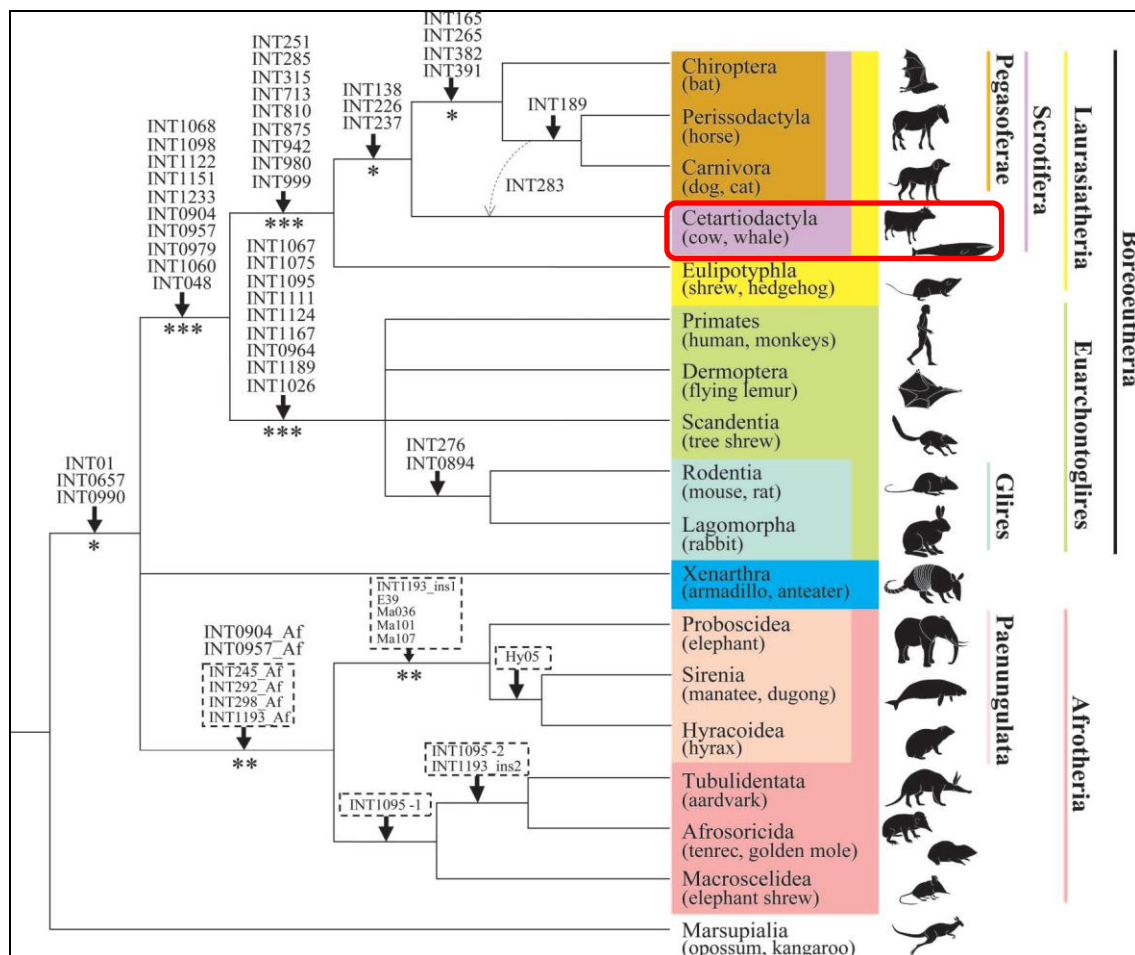


Figura 1. Clasificación filogenética molecular de la clase *Mammalia*.

Los artiodáctilos y los cetáceos forman el orden *Cetartiodactyla*. (Fuente: Nishihara et al. 2006).

Introducción

Hasta el momento se han descrito 78 especies de cetáceos vivos, formando dos subórdenes, *Mysticeti* (cetáceos con barbas - ballenas) y *Odontoceti* (cetáceos con dientes) (Reidarson 2003). Se ha determinado que la especie terrestre más cercana, probablemente sea el hipopótamo (Nikaído et al. 1999, Zhou et al. 2011) (Figura 2).

El análisis del genoma mitocondrial, tanto a nivel de gen como de proteína, ha permitido determinar un tiempo estimado de divergencia entre *Cetacea* e *Hippopotamidae* (familia dentro del orden *Artiodactyla*) de unos 53 – 54 millones de años.

Dentro del orden *Cetacea*, la divergencia entre los misticetos y los odontocetos tuvo lugar hace aproximadamente 30 millones de años. Desde un punto de vista anatómico, los cetáceos han sufrido modificaciones para adaptarse a un medio totalmente acuático. Poseen una capa de grasa subcutánea (en inglés “blubber”) que actúa como aislante. Los misticetos presentan barbas (aparato filtrador) compuestas por queratina y dos espiráculos, mientras que los odontocetos poseen dientes y un único espiráculo (Reidarson 2003).

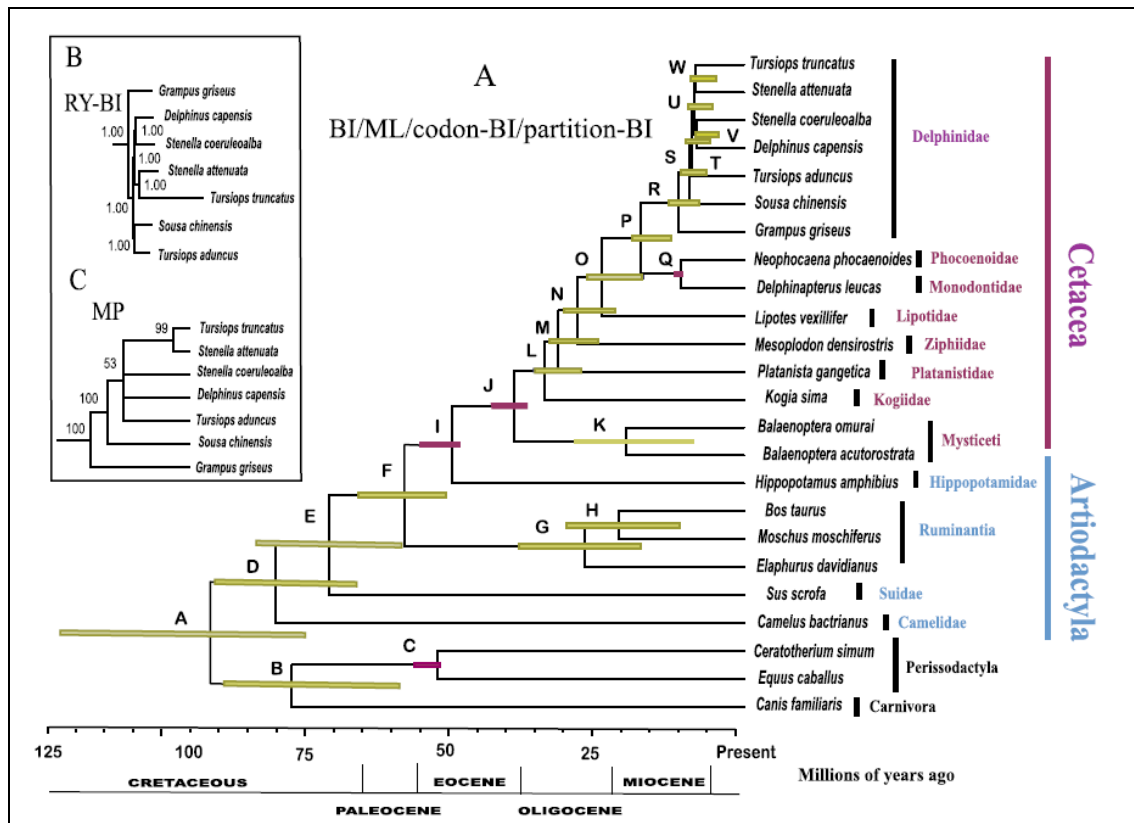


Figura 2. Filogenia molecular de las especies de cetáceos dentro del orden *Cetartiodactyla*

(Fuente: Zhou et al., 2011)

Los odontocetos se dividen en diez familias, seis de ellas marinas y cuatro de agua dulce. Dentro de los odontocetos marinos se encuentran : cachalotes (*Physeteridae*), belugas y narvales (*Monodontidae*), zifios (*Ziphiidae*), delfínidos como son los delfines, los calderones y las orcas (*Delphinidae*), marsopas (*Phocoenidae*) y el cachalote pigmeo y el enano (*Kogiidae*) (Tabla 1). Los delfines de río se encuentran clasificados dentro de la superfamilia de los *Platanistoidea* que agrupa a especies encontradas en rios de India (*Platanistidae*), de China (*Lipotidae*), en el Amazonas (*Iniidae*) y en el río de la Plata (*Pontoporiidae*).

Tabla 1. Clasificación de las especies de mamíferos marinos referenciadas en esta Tesis

ORDEN	SUBORDEN	FAMILIA	GENERO	ESPECIE		
				Nombre científico	Nombre en español	Nombre en inglés
Cetacea	Odontoceti	Delphinidae	<i>Cephalorhynchus</i>	<i>C. hectori</i>	delfín de Héctor	Hector's dolphin
			<i>Delphinus</i>	<i>D. capensis</i>	delfín común costero o de pico largo	long-beaked common dolphin
				<i>D. delphis</i>	delfín común	common dolphin
			<i>Feresa</i>	<i>F. attenuata</i>	orca pigmea	pygmy killer whale
			<i>Globicephala</i>	<i>G. macrorhynchus</i>	calderón tropical	long-finned pilot whale
				<i>G. melas</i>	calderón común	short-finned pilot whale
			<i>Grampus</i>	<i>G. griseus</i>	delfín de Risso o calderón gris	Risso's dolphin
			<i>Lagenodelphis</i>	<i>L. hosei</i>	delfín de Fraser	Fraser's Dolphin
			<i>Lagenorhynchus</i>	<i>L. acutus</i>	delfín del atlántico de flancos blancos	atlantic white-sided dolphin
				<i>L. albirostris</i>	delfín de hocico blanco	white-beaked dolphin
				<i>L. obliquidens</i>	delfín del pacífico de flancos blancos	pacific white-sided dolphins
				<i>L. obscurus</i>	delfín oscuro	dusky dolphin
			<i>Orcinus</i>	<i>O. orca</i>	orca	killer whale
			<i>Peponocephala</i>	<i>P. electra</i>	delfín de cabeza de melón	melon-headed whale
			<i>Pseudorca</i>	<i>P. crassidens</i>	falsa orca	false killer whale

Tabla 1 (cont. 1). Clasificación de las especies de mamíferos marinos referenciadas en esta Tesis

ORDEN	SUBORDEN	FAMILIA	GENERO	ESPECIE		
				Nombre científico	Nombre en español	Nombre en inglés
Cetacea	Odontoceti	Delphinidae	<i>Sotalia</i>	<i>S. guianensis</i>	delfín costero	guiana dolphin
			<i>Stenella</i>	<i>S. coeruleoalba</i>	delfín listado	striped dolphin
				<i>S. frontalis</i>	delfín pintado o delfín manchado del Atlántico	Atlantic spotted dolphin
			<i>Steno</i>	<i>S. bredanensis</i>	delfín de dientes rugosos	rough-toothed dolphin
			<i>Tursiops</i>	<i>T. adunctus</i>	delfín indo-pacífico	spotted bottlenose dolphin
				<i>T. truncatus</i>	delfín mular	bottlenose dolphin
		Kogiidae	<i>Kogia</i>	<i>K. breviceps</i>	cachalote pigmeo	pygmy sperm whale
				<i>K. sima</i>	cachalote enano	dwarf sperm whales
		Monodontidae	<i>Delphinapterus</i>	<i>D. leucas</i>	beluga	beluga whale
			<i>Monodon</i>	<i>M. monoceros</i>	narval	narwhal
		Phocoenidae	<i>Phocoena</i>	<i>P. phocoena</i>	marsopa común	harbour porpoise
				<i>P. spinipinnis</i>	marsopa espinosa	Burmeister's porpoise
		Physeteridae	<i>Physeter</i>	<i>P. macrocephalus</i>	cachalote	sperm whales
		Ziphiidae	<i>Ziphius</i>	<i>Ziphius cavirostris</i>	zifio de Cuvier	Cuvier's beaked whale

Tabla 1 (cont. 2). Clasificación de las especies de mamíferos marinos referenciadas en esta Tesis

ORDEN	SUBORDEN	FAMILIA	GENERO	ESPECIE		
				Nombre científico	Nombre en español	Nombre en inglés
Cetacea	Odontoceti	Ziphiidae	Mesoplodon	<i>M. densirostris</i>	zifio de Blainville	Blainville's beaked whale
			Mesoplodon	<i>M. stejnegeri</i>	zifio de Stejneger o zifio del mar de Bering	Stejneger's beaked whale
	Mysticeti	Balaenopteridae	Megaptera	<i>M. novaengliae</i>	yubarta o ballena jorobada	humpback whale
			Balaenoptera	<i>B. acutorostrata</i>	rorcual aliblanco	minke whale
			Balaenoptera	<i>B. physalus</i>	rorcual común	fin whales
		Balaenidae	Balaena	<i>B. mysticetus</i>	ballena boreal	bowhead whale
Carnivora	Caniformia	Phocidae	Monachus	<i>M. monachus</i>	foca monje del Mediterráneo	mediterranean monk seal
			Phoca	<i>P. vitulina</i>	foca común	harbour seal

I.2 Interés social y científico

Existen en la fauna, animales carismáticos que son destacados tanto por los medios de comunicación como por algunos grupos defensores del bienestar animal, como el panda gigante, los grandes simios, el delfín mular y las orcas. Estas especies sensibilizan tremendamente al público, y esta atención se traduce en fuertes enlaces emocionales y un gran interés. Este interés se ve expresado frecuentemente a través del cine, por ejemplo la orca Keiko, de la película mundialmente conocida “Liberad a Willy” (Bossart 1999). Los cetáceos en general, debido a su distribución mundial, son de las especies carismáticas más accesibles de ser avistadas en su medio natural. Esto conlleva la existencia de una creciente actividad económica asociada a la observación turística (whale-watching) de estas especies. También, los parques zoológicos desempeñan un papel en la educación ambiental de los cetáceos, que sirve para reforzar la relación emocional de los humanos hacia los cetáceos, y que tiene a la delfinoterapia como su máximo exponente. Por todo ello, los reportajes de caza de ballenas, de matanza de calderones en las islas Feroe (Dinamarca) (Figura 3), o de varamientos masivos, no solamente conmueven a la comunidad científica sino que también a la opinión pública.



Figura 3. Fotografía de la matanza de calderones en las islas Feroe.

(Fuente: <http://lacomunidad.elpais.com/loli/2010/10/15/matanza-calderones-las-islas-feroe->)

Introducción

Gracias a la presión de la comunidad científica y de la opinión pública se ha conseguido que el medio ambiente marino esté protegido por distintas leyes internacionales; por ejemplo, en el océano Atlántico norte y en Europa por las convenciones OSPAR (The Convention for the Protection of the marine Environment of the North-East Atlantic), HELCOM (Baltic Marine Environment Protection Commission); ASCOBANS (Agreement on the Conservation of Small Cetaceans of the Baltic and North Seas) y ACCOBAMS (Agreement on the Conservation of Cetaceans of the Black Sea, Mediterranean Sea and contiguous Atlantic Area).

La concienciación es un punto de partida esencial para conseguir mayores probabilidades de éxito en la protección de la biodiversidad en general, y para seguir investigando las problemáticas del mundo marino en particular.

Además de su importancia social, los cetáceos son especies de interés para la comunidad científica porque son “especies indicadoras”, cuya definición es: “Especie que por su estado ofrece información sobre la condición general de un ecosistema y de las otras especies de este ecosistema”; o “Especies que señalan la calidad y los cambios en las condiciones bióticas e abióticas en el medio ambiente” (UNEP Global Biodiversity Assessment¹). En este sentido, las especies bioindicadoras se conocen en conservación como “especies paraguas”, porque su conservación lleva implícita la de otras especies menos conocidas que comparten el mismo hábitat.

Los cetáceos también son indicadores porque muchas especies son bioconcentradoras de compuestos de origen antropogénico, debido a sus características tróficas y fisiológicas. Estas son: su longevidad, residen durante largo tiempo cerca de las costas, algunas como los odontocetos se sitúan en la cúspide de la cadena alimentaria, y tienen gran cantidad de grasa corporal que puede servir de almacenamiento para los tóxicos antropogénicos (Bossart 2010). En ellos, los contaminantes pueden seguir un proceso de biomagnificación y producir un efecto negativo en el *status* sanitario de estas poblaciones, por ejemplo induciendo inmunosupresión (Cámara 2007), disrupción endocrina y carcinogénesis (Martineau 2007).

¹ http://iufro-archive.boku.ac.at/silvavoc/glossary/28_0es.html

En conclusión, los cetáceos son buenos indicadores del estado del medio marino y también de la reducción de su biodiversidad (Bossart 2010).

II Amenazas

Existe un importante número de amenazas para la supervivencia de los cetáceos cuyos efectos más visibles son los varamientos. Un animal varado no puede volver al agua, por estar enfermo, herido, o atrapado en un entorno peligroso (Geraci et al. 1999). El animal puede llegar muerto a la costa, denominándose “varamiento pasivo”, o puede llegar aún vivo, denominándose “varamiento activo”. Otra consideración se hace según el número de animales que varan: si el animal “vara en solitario”, o si se trata de un “varamiento masivo”, donde dos o más cetáceos (excluyendo las parejas madre-cría) llegan a la costa vivos en el mismo sitio y al mismo tiempo. Estos últimos episodios suelen involucrar odontocetos pelágicos y sociales como son los *Globicephala* sp. (calderones) y los *Lagenorhynchus acutus* (delfín de flancos blancos) (Geraci et al. 1999).

Los varamientos afectan a algo más que a la salud y a las vidas de los animales implicados. Si el varamiento es masivo, el agente causal podría afectar al estado de salud del resto de la población o incluso de otras especies. A veces, estos varamientos plantean cuestiones de salud pública: enfermedades potencialmente transmisibles, contaminación de especies comestibles comerciales, o el uso de las aguas costeras (Geraci et al. 1999). La mayoría de los varamientos masivos de los últimos años han planteado serias cuestiones sobre el estado de salud del ecosistema, especialmente en relación con biotoxinas, contaminantes y ciertas actividades humanas. Con la creciente toma de conciencia pública, estos problemas, basados en hechos muchas veces pero también en especulaciones, han ganado una gran importancia política (Geraci et al. 1999).

En este sentido, el equipo responsable del varamiento debe estar preparado para determinar su causa, su impacto en la población y la salud del ecosistema, pero también debería poder transmitir cualquier advertencia de salud pública. Esta información puede ayudar en la toma de decisiones frente a eventos futuros con el objetivo de disminuir su frecuencia (Geraci et al. 1999).

Aunque las causas de los varamientos pueden ser múltiples (Figura 4), es importante diferenciar entre mortalidad basal – aquella causada por agentes o circunstancias a las cuales un animal está con frecuencia expuesto - y la mortalidad episódica - causada por condiciones medioambientales inhabituales o por una epizootia - (Geraci et al. 1999).

A continuación se hará hincapié en aquellas amenazas que podrían no estar relacionadas con la tasa de mortalidad basal normal de las poblaciones, estas son: traumatismos relacionados con actividades humanas, contaminantes, cambio climático, toxinas naturales, enfermedades parasitarias e infecciosas (Figura 4). En esta Tesis, el estudio se centra en casos donde la causa del varamiento es por enfermedad (causa nº8 de la Figura 4), más concretamente, en la detección molecular y de lesiones compatibles con las enfermedades infecciosas víricas causadas por Morbillivirus y Herpesvirus. Por último, se debe considerar que el varamiento puede tener un origen multifactorial.

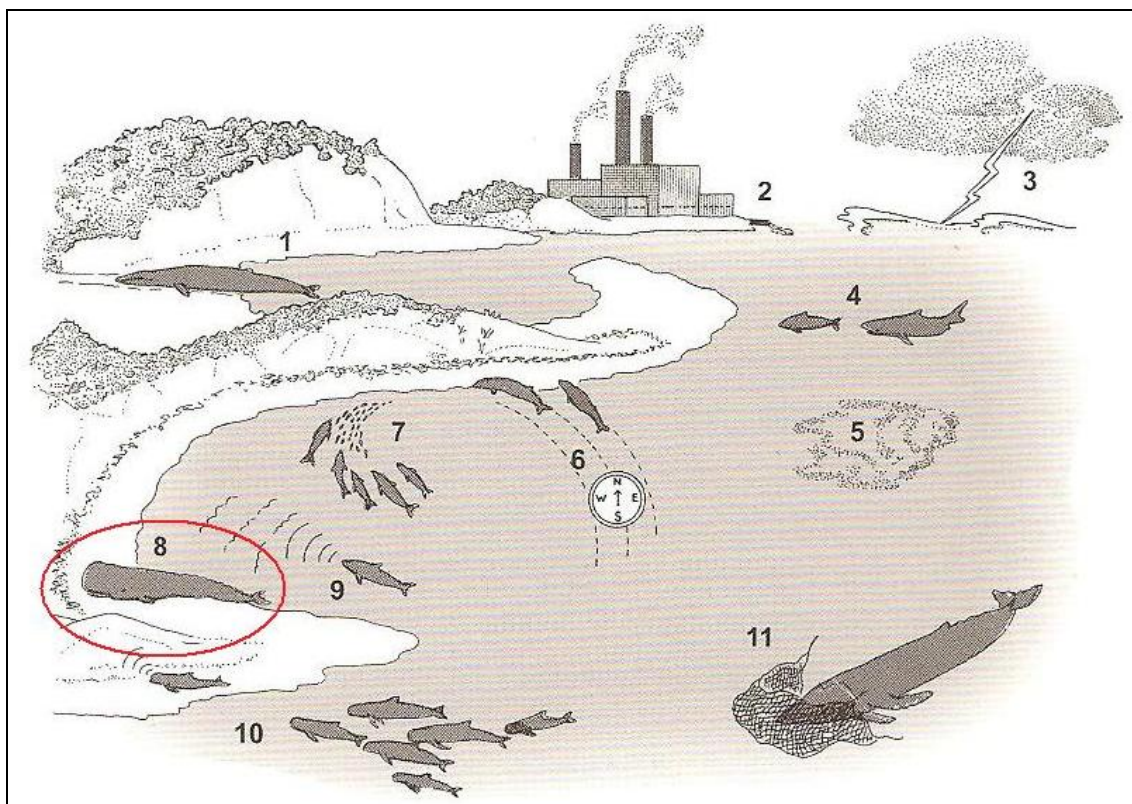


Figura 4. Posibles causas de varamiento de cetáceos.

(Fuente: Geraci and Lounsbury, 2005). 1. Condiciones topográficas y oceanográficas complejas. 2. Contaminantes. 3. Condiciones climáticas. 4. Depredadores. 5. Toxinas naturales. 6. Disturbios geomagnéticos y errores en la navegación en el seguimiento de contornos geomagnéticos. 7. Seguimiento de presas cerca de la costa. 8. Enfermedad. 9. Disturbio de la ecolocación en aguas poco profundas. 10. Cohesión social. 11. Lesiones relacionadas con actividades humanas.

II.1 Amenazas en relación directa con actividades humanas

Existen actividades humanas que tienen sobre los cetáceos un impacto negativo pudiendo afectar a pocos, pero también a una cantidad ingente de individuos.

Es importante recalcar que a pesar de la creciente preocupación pública y de las leyes de protección, los traumatismos por colisión con barcos (De Stephanis & Urkiola 2006) o por interacción con pesca continúan siendo factores que siguen afectando a gran escala (Geraci et al. 1999).

También son factores importantes la contaminación acústica (Fernandez et al. 2005), la sobreexplotación de los recursos pesqueros, la captura de cetáceos, o la presión turística excesiva (Culik 2004).

II.2 Contaminantes antropogénicos

Los delfines son longevos, se nutren a un nivel trófico alto y tienen grandes reservas de grasa donde pueden acumularse contaminantes antropogénicos (Bossart 2010), los compuestos organohalogenados y los metales pesados (Mancia et al. 2010). Los derrames de petróleo o los vertidos tóxicos puntuales de contaminación costera inciden sobre los recursos tróficos de estas poblaciones pudiendo alterar su comportamiento e incluso su supervivencia.

Aunque no se haya demostrado si existe una relación causa / efecto directa entre la movilización de las grasas al torrente circulatorio (por ende la liberación de contaminantes lipofilos acumulados) y una posible inmunosupresión (Cámara 2007), es importante subrayar que en la epidemia por morbillivirus registrada en 1990 en el mar Mediterráneo, se detectaron elevadas concentraciones de contaminantes antropogénicos en los *Stenella coeruleoalba* (delfines listados) (Aguilar & Borrell 1994). Además, algunos de los *Tursiops truncatus* (delfines mulares) muestreados durante la epizootia de 1987-1988, mostraron niveles de organoclorados que se encontraron entre los más altos nunca registrados en cetáceos (Geraci et al. 1999).

Aunque el deterioro de la función inmune juega un papel importante frente a las infecciones por morbillivirus, es difícil determinar si la contaminación ha contribuido significativamente a la amplitud y gravedad de las recientes epizootias en mamíferos marinos. La supresión inmune observada, junto con otros factores antropogénicos, podrían haber creado condiciones que facilitasen la emergencia de las epizootias por morbillivirus en los mamíferos marinos, aunque es importante considerar que a día de hoy, esta posibilidad sigue siendo una especulación (Osterhaus et al. 1995).

II.3 Condiciones climáticas

Algunos tipos de mortalidad están directamente relacionados con condiciones climáticas adversas y muchos cetáceos varan emaciados debilitados por estar lesionados o enfermos (Geraci & Lounsbury 2005).

El hombre también puede influir de forma indirecta sobre diversos factores globales como el cambio climático o los agujeros de ozono, que redundan en cambios en ciertas características del medio marino como la temperatura, salinidad, nutrientes y pH (en este último caso debido a que el aumento de CO₂ antropogénico produce la acidificación del medio marino) (Caldeira & Wickett 2003). Estos cambios pueden ejercer un efecto devastador en la supervivencia de las especies marinas (Gambaiani et al. 2009, Bossart 2010). Una de las consecuencias más directas del cambio climático es el descenso en los recursos alimenticios de las poblaciones. Este descenso puede alterar el comportamiento y los patrones de movimiento de las poblaciones de mamíferos marinos (Lavigne & Schmitz 1990), producir la merma de la condición corporal de los animales, e incluso inducir mortalidad.

Por otro lado, el cambio climático podría estar influenciando la aparición de epizootias por morbillivirus en pinnípedos, ya que al aumentar la temperatura del agua, éstos salen con más frecuencia a las costas, y al aumentar su densidad, aumenta la probabilidad de transmisión del virus (Lavigne & Schmitz 1990). En el mar Mediterráneo, las temperaturas anormalmente altas del invierno 1989-1990 fueron aparentemente responsables de un descenso en el pico de productividad que ocurre normalmente cada primavera en esta región, y que es de suma importancia para la dinámica del ecosistema (Aguilar & Raga 1993).

Si este efecto se confirmara, sería razonable suponer que un descenso en la productividad condujera a una reducción del alimento disponible, e implicaría que los animales, ya debilitados, fuesen incapaces de sobreponerse a la enfermedad, hecho que produciría un aumento en la tasa de mortandad final de la infección por morbillivirus (IM) (Aguilar & Raga 1993).

II.4 Floraciones algales tóxicas

Las toxinas producidas por algunas algas marinas y acumuladas en los peces o invertebrados pueden intoxicar y matar a los cetáceos. Diferentes episodios de mortalidad masiva de cetáceos han sido registrados como consecuencia de la intoxicación con las siguientes ficotoxinas: saxitoxina producida por el dinoflagelado *Alexandrium tamarense*, brevetoxina, producida por el dinoflagelado *Karenia brevis* responsable de la “marea roja”, y el ácido domoico, neurotoxina producida por la diatomea *Pseudonitzschia spp.* (Geraci & Lounsbury 2005). La intoxicación y muerte de catorce *Megaptera novaengliae* (ballena jorobada) en la bahía de Cabo Cod en la costa este de EEUU, fue la primera evidencia de que las biotoxinas algales podían ser el origen de ciertos varamientos (Geraci 1989, Duignan et al. 1995b).

La exposición crónica a estas toxinas puede afectar la salud de las poblaciones. Al cabo del tiempo, las brevetoxinas son potentes neurotoxinas que además pueden comprometer el sistema inmune, incrementando la susceptibilidad a los agentes infecciosos. La exposición a saxitoxinas puede poner en peligro las condiciones de buceo y alimentación, y también aumentar la vulnerabilidad a los choques con embarcaciones (Geraci & Lounsbury 2005).

Las floraciones algales se van haciendo más numerosas y se expanden en un rango geográfico mayor que antes, quizás exacerbado por la contaminación y otros cambios climáticos globales (Anderson 1994, Bossart 1999, Geraci et al. 1999). Por ello, los riesgos de exposición de los mamíferos marinos a las ficotoxinas podrían estar en aumento. Poblaciones pequeñas, relativamente bien localizadas, como son las focas monje y los manatíes de Florida, son especialmente vulnerables (Bossart 1999, Geraci et al. 1999).

II.5 Papel de las enfermedades parasitarias e infecciosas en los varamientos.

Las condiciones ambientales adversas, incluyendo los cambios climáticos, pueden crear cambios en el ecosistema, como alteraciones en la abundancia de alimento o en la prevalencia de mediadores infecciosos/tóxicos (Geraci & Lounsbury 2005). Pero también los agentes infecciosos y parasitarios pueden influir de manera directa o indirecta en la salud de los cetáceos.

II.5.1 Agentes parasitarios

Los agentes parasitarios que se encuentran con más frecuencia en los cetáceos son los nematodos pulmonares. En el caso de los nematodos de pequeño tamaño pertenecientes al género *Stenurus*, no existe evidencia clara de que causen varamientos, pero sí se asocian a una pérdida de condición corporal (Geraci & Lounsbury 2005). Sin embargo, otros nematodos pulmonares se han asociado claramente a enfermedad y mortalidad. Por ejemplo los nematodos de los géneros *Pseudalius* y *Torynurus* frecuentemente se asocian a infecciones bacterianas secundarias y a neumonías graves en algunas poblaciones de marsopas (Geraci & Lounsbury 2005).

Los nematodos largos del género *Crassicauda*, algunos de los cuales pueden medir 7 m de longitud, son de lejos los parásitos más agresivos para su hospedador ya que pueden infectar diferentes tejidos, incluido el riñón, y con ello presentar consecuencias patológicas graves (Gibson et al. 1998, Jauniaux et al. 2000, Geraci & Lounsbury 2005). Además, se han descrito migraciones aberrantes a través del encéfalo del trematodo *Nasitrema*, produciendo el varamiento de varias especies de cetáceos.

Los protozoos son generalmente inofensivos, aunque las formas oportunistas (por ejemplo *Toxoplasma gondii*) tendrán un efecto debilitador sobre individuos que ya padezcan una enfermedad generada por otro patógeno, como por ejemplo los virus del género *morbillivirus* (Inskeep et al. 1990, Geraci & Lounsbury 2005).

II.5.2 Agentes infecciosos bacterianos y fúngicos

Las bacterias del género *Brucella* son potenciales agentes patógenos primarios, como ocurre en los mamíferos terrestres, asociándose con abortos, lesiones del tracto reproductivo y lesiones encefálicas (Geraci & Lounsbury 2005). Las bacterias de género *Vibrio*, *Streptococcus* y *Salmonella*, por ejemplo, se encuentran comúnmente en animales sanos (Geraci & Lounsbury 2005). Sin embargo, pueden producir infecciones secundarias a procesos traumáticos, parasitarios, víricos, o en general, en cualquier cuadro que implique estrés en el animal (Geraci & Lounsbury 2005). La especie bacteriana *Erysipelothrix rhusiopathiae* que produce el mal rojo de los suidos, también se ha asociado con cuadros cutáneos y sistémicos en cetáceos y humanos, es una zoonosis cuya forma sistémica puede ser mortal tanto en humanos como en animales (Melero et al. 2011).

El agente fúngico causante de la lobomycosis (Murdoch et al. 2008, Kiszka et al. 2009), la levadura *Lacazia loboi*, produce granulomas dérmicos y subcutáneos que solamente se han descrito en humanos y delfines (Rotstein et al. 2009), aunque la que afecta a estos últimos podría tratarse de una especie diferente a *Lacazia loboi*, y por ende, no ser zoonótica (Esperón et al. 2012).

III Papel de las enfermedades víricas en el estado de salud de los cetáceos

El papel ecológico más importante de los microorganismos, y en particular de los virus en cetáceos (por ejemplo morbillivirus) es probablemente su asociación con varamientos masivos (Geraci et al. 1999). Determinar si un patógeno es primario o simplemente un agente secundario que produce enfermedad en un animal ya debilitado no siempre es sencillo. El enfoque clásico que requiere la designación de un organismo como la causa de una enfermedad en particular (en humanos) se definió por primera vez por Robert Koch en 1884. Los postulados de Koch estipulan que (1) el mismo microorganismo debe ser encontrado en cada enfermo y no en los individuos sanos, (2) el microorganismo debe ser aislado y crecido en laboratorio, (3) debe reproducir la enfermedad por sí mismo cuando se inocule en individuos sanos, (4) el mismo organismo debe ser encontrado en estos individuos y recuperado de cultivo en laboratorio.

Introducción

Los requerimientos para cumplir los postulados de Koch no siempre se pueden reunir. La obtención de este tipo de información es a menudo difícil en epidemias humanas bien estudiadas; y realmente complicado en casos de mortandades de cetáceos. La experimentación con mamíferos marinos no es posible por impedimentos éticos y logísticos, y los resultados obtenidos en investigaciones con animales de laboratorio no son siempre transferibles a especies marinas que pueden representar 10000 veces su masa.

En este sentido, la pauta a seguir es la de eliminar otras posibles causas, una a una, hasta que las pruebas indiquen un patógeno que: (1) se aisle de los animales infectados, (2) tenga el potencial de producir las lesiones observadas o las condiciones clínicas, y (3) pueda propagarse de un modo que explicase el patrón de mortalidad observado (Geraci et al. 1999).

Dicha situación se complica debido a que los patógenos no siempre producen enfermedad, y que la expresión de la enfermedad está, en gran medida, determinada por atributos del hospedador, como la edad, el estado de salud general, y parámetros ambientales (Figura 5). Los individuos, e incluso las poblaciones, pueden albergar (y propagar) agentes infecciosos sin mostrar signos de enfermedad (Geraci et al. 1999).

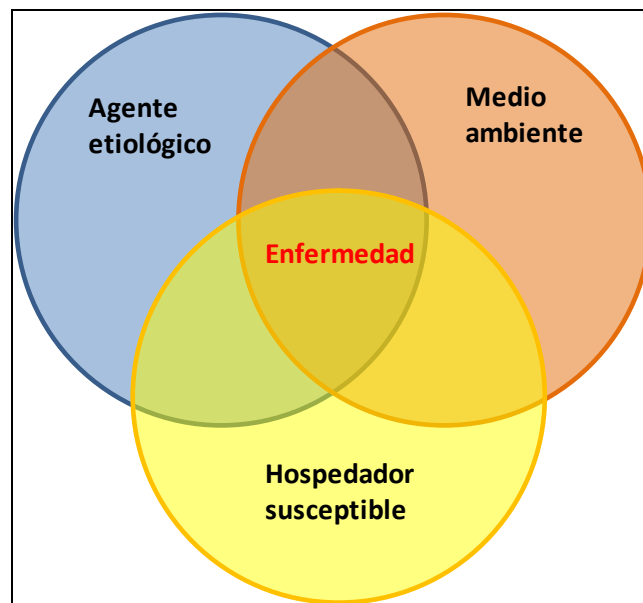


Figura 5. Factores necesarios al desarrollo de una enfermedad.

El desarrollo de una enfermedad es consecuencia de la interacción entre tres factores: especie hospedadora susceptible al agente etiológico, el agente etiológico, y las condiciones medio ambientales.

Hacia el final de los años 1970, pocos virus se habían descrito en mamíferos marinos (Smith & Skilling 1979), y se consideraba que jugaban un papel menor en las causas de mortalidad. Desde 1980, la lista de virus se ha incrementado considerablemente y ha cobrado importancia su significado sanitario, tanto a nivel individual como poblacional.

En la Tabla 2, se indican los virus detectados más frecuentemente en cetáceos. En 1988, se describen por primera vez virus del género *Morbillivirus*, considerados como los agentes causales de mortalidad de pinnípedos y cetáceos (Kennedy et al. 1988a, Kennedy et al. 1988b, Van Bressem et al. 2009a).

Con posterioridad, en los años 1990, se detectaron herpesvirus, papilomavirus y poxvirus con mayor frecuencia. Debido a un mayor número de casos, en la actualidad se reconoce la importancia de estos virus en la salud de las poblaciones de cetáceos y son los virus que más detenidamente se han estudiados (Tabla 2).

Tabla 2. Virus detectados más frecuentemente en cetáceos

Familia	Virus	Referencias
<i>Paramyxoviridae</i>	<i>Morbillivirus</i>	(Kennedy et al. 1988a, Kennedy et al. 1988b, Van Bressem et al. 2009a)
<i>Herpesviridae</i>	<i>Herpesvirus</i>	(Kennedy et al. 1992b, Blanchard et al. 2001, Smolarek Benson et al. 2006)
<i>Papovaviridae</i>	<i>Papillomavirus</i>	(Bossart et al. 1996, Rehtanz et al. 2006)
<i>Chordopoxviridae</i>	<i>Poxvirus</i>	(Bracht et al. 2006)

Adicionalmente, se han reportado casos esporádicos de infección por otros virus cuyo impacto sanitario en las poblaciones de cetáceos se desconoce en la actualidad. Estos se han agrupado en la Tabla 3.

Tabla 3. Virus de cetáceos detectados de forma esporádica

Familia	Nombre propuesto para la putativa especie viral (Traducción al español)	Referencias
<i>Caliciviridae</i>	cetacean calicivirus (calicivirus de cetáceo)	(Smith et al. 1987, Reid et al. 1999)
<i>Rhabdoviridae</i>	dolphin rhabdovirus-like virus (rhabdovirus-like de delfín)	(Osterhaus et al. 1993)
<i>Hepadnaviridae</i>	hepatitis B-like virus (virus de la hepatitis B-like)	(Bossart et al. 1990)
<i>Adenoviridae</i>	adenovirus	(Smith & Skilling 1979, Smith et al. 1987, Van Bressem et al. 1999)
<i>Orthomyxoviridae</i>	influenza A virus (virus de influenza A)	(Lvov et al. 1978, Hinshaw et al. 1986, Van Bressem et al. 1999)
<i>Flaviviridae</i>	St. Louis Encephalitis (virus de la encefalitis de St. Louis)	(Buck et al. 1993)
<i>Paramyxoviridae</i>	Tursiops truncatus parainfluenza virus type 1 (TtPIV-1) (virus parainfluenza de Tursiops truncatus de tipo 1)	(Venn-Watson et al. 2008)
<i>Coronaviridae</i>	Coronavirus SW1	(Mihindukulasuriya et al. 2008)

III.1 Técnicas de diagnóstico empleadas en virología de cetáceos

III.1.1 Detección del antígeno

Para conseguir un buen diagnóstico de la causa de muerte de un animal, además de observar lesiones macroscópicas y microscópicas, es necesaria la detección del antígeno *in situ* mediante diferentes métodos tradicionales como son la microscopía electrónica de transmisión (MET) y la inmunohistoquímica (IHQ).

Por otra parte, el antígeno puede ser detectado en suero o en macerados de tejidos mediante el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas directo (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA directo). Para ilustrar en qué consisten las técnicas inmunológicas de la IHQ y del ELISA directo, se describe a continuación el desarrollo de un ELISA directo, donde se puede apreciar que si la muestra contiene el antígeno del virus que se pretende detectar, éste está neutralizado mediante anticuerpos monoclonales seguido de una etapa de revelado (Figura 6).

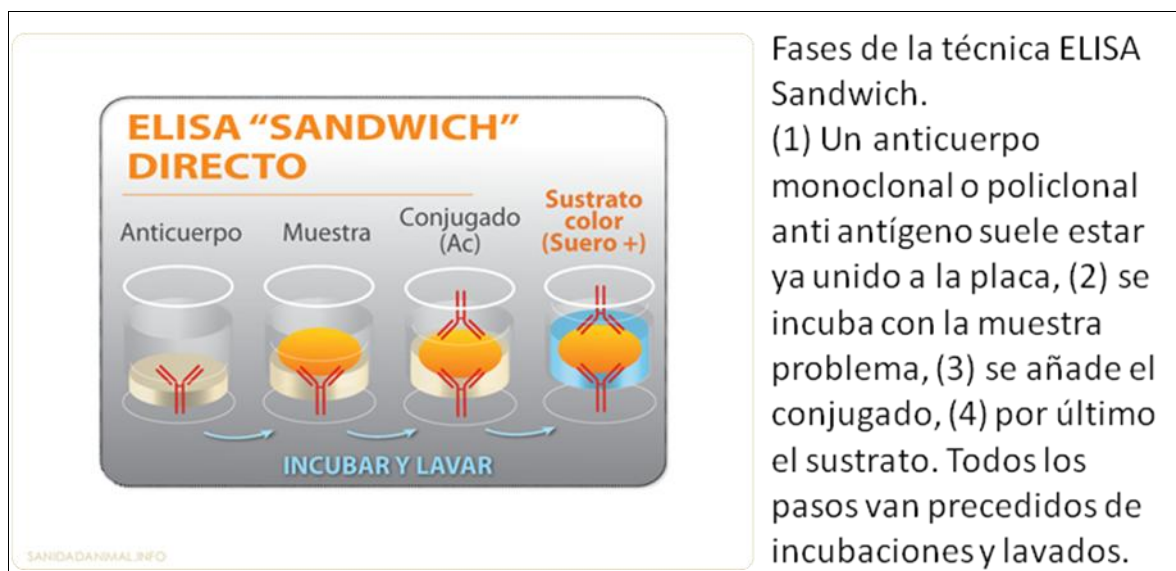


Figura 6. Esquema general del desarrollo de un ELISA directo o ELISA "SANDWICH".

(Fuente: Curso de Introducción a la inmunología porcina, 3 ed. Profesor Sánchez-Vizcaíno²).

² <http://sanidadanimal.info/cursos/inmunologia3/ca051.htm>

Introducción

Además de las técnicas mencionadas anteriormente, en los últimos años, debido al auge de la biología molecular, destacan principalmente las basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR).

Las técnicas moleculares presentan la ventaja de poder usarse en tejidos autolíticos donde no es posible usar la IHQ ni la histopatología. Otra ventaja de las técnicas de biología molecular, es que las secuencias de ácido nucleico obtenidas se puedan secuenciar y a partir de ellas, se pueda realizar estudios de filogenia molecular para la identificación del agente causal.

Básicamente, la técnica de la PCR consta de tres fases principales. La primera es la extracción del ácido nucleico. Los protocolos utilizados para la detección molecular de CeMV y HV se pueden consultar en el apartado de “Anexos” al final de esta Tesis, y esta primera fase se corresponde con la extracción de ARN (ácido ribonucleico) por el método trizol-cloroformo-isopropanol para la detección de CeMV (Protocolo 1) y con la extracción de ADN (ácido desoxiribonucleico) por un kit comercial de Roche® para la detección de ADN (Protocolo 2). La segunda fase se corresponde con la reacción de la PCR propiamente dicha, cuyo programa se desarrolla en un termociclador. En la segunda fase, si el genoma es ARN, como es el caso de morbillivirus, se necesita un paso previo de retrotranscripción de la hebra sencilla de ARN a hebra doble de ADN, y de allí se realiza la PCR. Esta técnica se denomina PCR con retrotranscripción (PCR with retrotranscription, RT-PCR) (Figura 7). Para la detección de CeMV, en esta Tesis se han usado las siguientes RT-PCR: la RT-PCR universal para morbillivirus del gen de la fosfoproteína (Barrett et al. 1993, Yang et al. 2006) (Protocolo 3) y la RT-PCR de CeMV del gen de la proteína de fusión (Bellière 2008, Artículo 3, 2010) (Protocolo 4). En esta segunda fase, si el genoma es ADN, como es el caso de Herpesvirus (HV), se procede directamente a la amplificación del ADN por PCR, y para la detección de HV se ha utilizado la PCR universal del gen de la polimerasa (VanDevanter et al. 1996) (Protocolo 5).

Debido a que el ARN se degrada muy fácilmente, sería importante usar un control interno para asegurarse de que el ARN de la muestra no está degradado. En este sentido, es adecuado el protocolo propuesto por Krafft et al. (1995) que amplifica el ARNm de la β -actina.

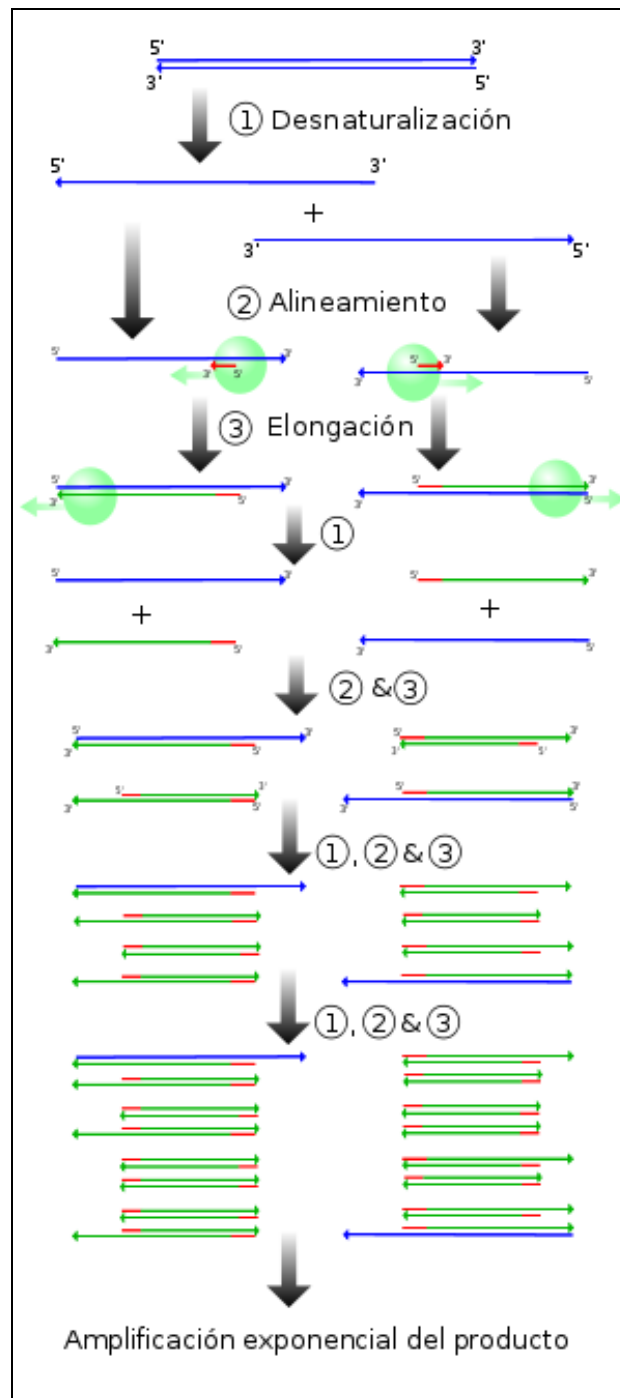


Figura 7. Esquema general de la reacción de la PCR³.

Cada ciclo del programa del termociclador se repite un número determinado de veces y se compone de tres fases: (1) desnaturalización de la doble hebra de ADN en dos hebras sencillas, (2) una fase de alineamiento de los cebadores y (3) fase de elongación. El resultado es la amplificación del fragmento de ADN diana.

³ http://www.google.es/imgres?imgurl=http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/9/95/PCR_es.svg/300px-PCR_es.svg.png&imgrefurl=http://es.wikipedia.org/wiki/Reacci%25C3%25B3n_en_cadena_de_la_polimerasa&usq=dqWFKiSZ6W-Iff6Yqg0rAUvYkg=&h=675&w=300&sz=26&hl=es&start=1&zoom=1&tbnid=izZSf004dMHhsM:&tbnh=138&tbnw=61&ei=L95HT-7oN6HU0QXmvaiIDg&prev=/search%3Fq%3DPCR%26hl%3Des%26gbv%3D2%26tbn%3Disch&itbs=1

Introducción

Finalmente, la tercera fase se corresponde con la lectura de los resultados (Figura 8). Es decir que una vez realizada la PCR (o RT-PCR) en un termociclador, se carga cada muestra en un gel de agarosa para proceder a su lectura bajo luz ultravioleta y comprobar que el fragmento amplificado se corresponde con el tamaño esperado (Figura 8).

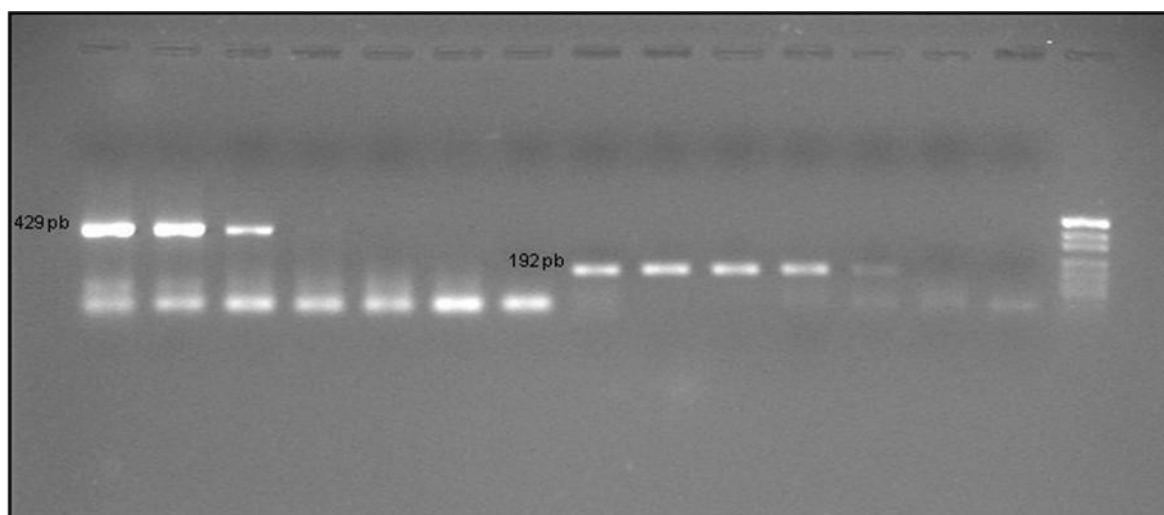


Figura 8. Gel de lectura de RT-PCR convencional.

(Fuente: Documento presentado por optar a la Suficiencia Investigadora - Bellière, 2008). Comparación de las RT-PCR del gen de la fosfoproteína que amplifica un fragmento de 429 pb (a la izquierda) (Barrett et al. 1993, Yang et al. 2006) y del gen de la proteína de fusión que amplifica un fragmento de 192 pb (a la derecha) (Artículo 3 2010). Diluciones del control positivo DMV cepa muc en base 10 (cedido por Dr. Tom Barrett, Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory, UK).

Para la identificación definitiva del agente, es necesario proceder a la secuenciación del producto amplificado, y su posterior comparación con la base de datos del Genbank.

Posteriormente, para la comparación de la secuencia obtenida con el resto de secuencias, se debe construir un árbol filogenético cuyo algoritmo utilizado en los artículos que componen esta Tesis fue el método de distancia del vecino más cercano (Neighbor Joining).

III.1.2 Detección del anticuerpo

Además de las técnicas inmunológicas de detección del antígeno como son el ELISA directo y la IHQ expuestas en el apartado (III.1.1), existen técnicas inmunológicas de detección de anticuerpos en el suero del animal (recogido del animal vivo o recién muerto) como son el ELISA indirecto (iELISA), la virusneutralización (VN) o la neutralización por reducción de placas (Van Bresse et al. 2001).

Las tres se basan en detectar si en el suero del animal existen anticuerpos específicos del virus estudiado, por ejemplo del morbillivirus. Para ilustrar en qué consisten las técnicas inmunológicas de detección del antígeno, se describe a continuación el desarrollo de un iELISA (Figura 9). Es importante subrayar que en el caso de morbillivirus, el iELISA permite la detección de anticuerpos dirigidos frente a las siguientes proteínas : nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), proteína de fusión (F) y proteína de la hemaglutinina (H); mientras que mediante VN solamente se detectan anticuerpos frente a las glicoproteínas de superficie (F y H) (Van Bresse et al. 1998b). De ahí que algunos sueros positivos en el iELISA pueden salir negativos en los tests de VN (Van Bresse et al. 1998b).

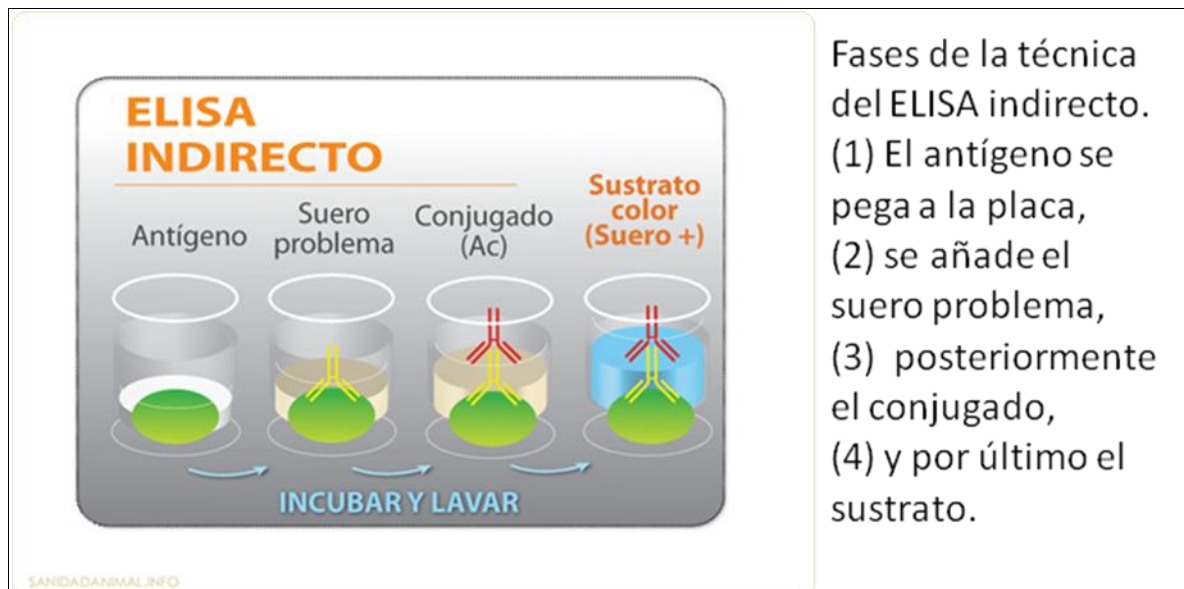


Figura 9. Esquema de desarrollo de la técnica del ELISA indirecto.

(Fuente: Curso de Introducción a la inmunología porcina, 3 ed. Profesor Sánchez-Vizcaíno⁴).

Es importante subrayar que el uso de técnicas inmunológicas para la detección del antígeno viral (IHQ, ELISA) o para la detección de anticuerpos en el suero del animal (iELISA, VN, neutralización por reducción de placas) pueden entrañar una importante falta de especificidad. Por ejemplo, debido a las reacciones cruzadas de los anticuerpos frente a los antígenos de las diferentes especies de morbillivirus, las técnicas serológicas no permiten determinar qué CeMV está implicado (ver apartado IV.1.1 los tipos de CeMV) (Visser et al. 1993, Duignan et al. 1995b), tampoco es posible con la MET.

⁴ <http://sanidadanimal.info/cursos/inmunologia3/ca051.htm>

Sólo un diagnóstico molecular, es decir RT-PCR y posterior secuenciación, permite realizar un análisis comparativo de las secuencias (estudio filogenético), identificar el clado donde se clasifica la secuencia, y por ende, el virus detectado. La sospecha de IM en mamíferos marinos siempre deberá ser confirmada por histología e IHQ, o serología. La RT-PCR y la secuenciación del producto de RT-PCR son altamente recomendables para llegar a un diagnóstico definitivo (Domingo et al. 2002).

III.2 Reseña de los virus de cetáceos más importantes

El virus más relevante desde el punto de vista sanitario en cetáceos es el morbillivirus del cetáceo (*Cetacean morbillivirus*, CeMV), causante de diversas epizootias desde 1987. Además, existen otros virus como los herpesvirus, poxvirus y papilomavirus de las familias *Herpesviridae*, *Chordopoxviridae* y *Papovaviridae*, respectivamente, que se han relacionado con lesiones en piel (Baker 1992). Los herpesvirus y los papilomavirus también producen lesiones en mucosas (Van Bressem et al. 1999). Los morbillivirus de cetáceo y herpesvirus (HV), pertenecientes respectivamente a las familias *Paramyxoviridae* y *Herpesviridae*, se describirán más detalladamente (ver puntos II y III). Los CeMV y HV son objeto de estudio de esta tesis debido a que : (1) el CeMV es un virus que ha producido varias epizootias en el mundo entero, y (2) los HV se han detectado como agente causal primario de infección sistémica seguida de muerte en al menos tres individuos (Kennedy et al. 1992b, Blanchard et al. 2001). Este trabajo se centrará en la información existente sobre estos virus **hasta la aceptación de los artículos presentados en esta Tesis**. Los datos publicados posteriormente por otros autores, se comentarán en la discusión. A continuación, se procede a una breve reseña de los virus descritos en cetáceos pertenecientes a las familias *Chordopoxviridae* y *Papovaviridae*, respectivamente.

III.2.1 Familia Chordopoxviridae

Son virus grandes, con envuelta cuyo genoma es ADN bicatenario de un tamaño de 130-380 Kb. Los poxvirus detectados en cetáceos seguramente pertenezcan a un nuevo género, cuyo ancestro más inmediato sea el género *Orthopoxvirus* (Bracht et al. 2006). Se han detectado en cetáceos en cautividad y en libertad (Van Bressem et al. 1999, Bracht et al. 2006, Van Bressem et al. 2007b, Van Bressem et al. 2009a, Van Bressem et al. 2009b). En cetáceos, mediante identificación molecular, se han hallado secuencias en diferentes especies de odontocetos que se han asignado a una nueva especie de poxvirus, como es el “poxvirus de cetáceo 1” (cetacean poxvirus 1, CPV-1).

Por otro lado, la secuencia detectada de una piel de un cetáceo mysticeto se atribuye temporalmente al grupo CPV-2 (Bracht et al. 2006). Previamente, también se había descrito infección por poxvirus en muchas especies de cetáceos (Tabla 4).

Tabla 4. Listado de las especies de cetáceos en las cuales se ha detectado poxvirus

Especie de cetáceo	Diagnóstico molecular	Nombre propuesto para la putativa especie viral	Referencia
<i>Balaena mysticetus</i> (ballena boreal)	Sí	CPV-2	(Bracht et al., 2006)
<i>Cephalorhynchus hectori</i> (delfín de Héctor)	No	nd	(Baker, 1992b; Geraci et al., 1979; Van Bresseem et al., 1999; VanDevanter et al., 1996)
<i>Delphinus capensis</i> (delfín común costero)	No	nd	(Van Bresseem and Van Waerebeek, 1996)
<i>Delphinus delphis</i> (delfín común)	No	nd	(Britt and Howard, 1983)
<i>Lagenorhynchus acutus</i> (delfín atlántico de flancos blancos)	No	nd	(Geraci et al., 1979)
<i>Lagenorhynchus albirostris</i> (delfín de hocico blanco)	No	nd	(Baker, 1992b)
<i>Lagenorhynchus obscurus</i> (Delfín oscuro)	No	nd	(Van Bresseem et al., 1993a)
<i>Globicephala melas</i> (calderón común)	No	nd	(Baker, 1992b)
<i>Phocoena phocoena</i> (marsopa común)	No	nd	(Baker, 1992a, b)
<i>Phocoena spinipinnis</i> (marsopa espinosa)	No	nd	(Van Bresseem and Van Waerebeek, 1996; Van Bresseem et al., 1993a)
<i>Sotalia guianensis</i> (delfín costero)	No	nd	(Van Bresseem et al., 2009a)
<i>Stenella coeruleoalba</i> (delfín listado)	No	nd	(Baker, 1992b)
	Sí	CPV-1	(Bracht et al., 2006)
<i>Steno bredanensis</i> (delfín de dientes rugosos)	Sí	CPV-1	(Bracht et al., 2006)
<i>Tursiops aduncus</i> (delfín indo-pacífico)	Sí	CPV-1	(Bracht et al., 2006)
<i>Tursiops truncatus</i> (delfín mular)	No	nd	(Flom and Houk, 1979; Geraci et al., 1979; Smith et al., 1983; Van Bresseem et al., 2003)
	Sí	CPV-1	(Bracht et al., 2006)

CPV-1: "cetacean poxvirus 1" (poxvirus de cetáceo 1); CPV-2: "cetacean poxvirus 2" (poxvirus de cetáceo 2).

Introducción

Los poxvirus de cetáceos no causan grandes brotes de mortandad; sin embargo, las infecciones por este virus pueden ocasionar mortalidad en individuos jóvenes sin inmunidad protectora y por ello causar un efecto deletéreo global en las poblaciones afectadas (Van Bressem et al. 1999).

Los poxvirus en cetáceos pueden estar presentes durante meses e incluso años sin producir síntomas, en forma de anillos o cabezas de alfiler negros que pueden dar lugar a lesiones en forma de tatuaje “tattoo lesions” de 0,5 a 3 cm de diámetro (Kennedy-Stoskopf 2001, Van Bressem et al. 2009b), y que pueden ser más oscuras en los bordes (Geraci et al. 1979). Estas lesiones en piel, melánicas y con aspecto de tatuaje, contrastan con las lesiones proliferativas observadas en otros mamíferos (Geraci et al. 1979). Se observan en cualquier parte del cuerpo, más en dorso, sobre todo cabeza, aletas pectorales, dorsal y cola (Bracht et al. 2006). Histológicamente, se observa engrosamiento del estrato externo de la epidermis, así como vacuolización y presencia de cuerpos de Bollinger (Hess et al. 2011), que son cuerpos de inclusión eosinófilos pequeños y esféricos/irregulares en las células del estrato intermedio. Además del uso de la histopatología y de técnicas moleculares, para su diagnóstico también se ha empleado la MET (Geraci et al. 1979, Van Bressem et al. 1993a, Bracht et al. 2006).

Si bien las enfermedades por poxvirus con lesiones de tipo “tattoo” parecen ser específicas de los cetáceos (Bracht et al. 2006), se recomienda la protección mediante guantes para manipular cetáceos, vivos o muertos, con lesiones compatibles (Van Bressem et al. 2009a).

III.2.2 Familia Papovaviridae

Los papilomavirus son virus epiteliotropos sin envuelta cuyo genoma es ADN bicatenario de 8 Kb (Van Bressem et al. 2009a). A pesar de observarse desde hace tiempo papilomas cutáneos (Bossart et al. 1996) y en distintas superficies mucosas, como en genital (Lambertsen et al. 1987), gástrica (De Guise et al. 1994), y lingual (Van Bressem et al. 1996), sólo se ha podido demostrar recientemente mediante diagnóstico molecular que el agente etiológico implicado en estas lesiones es un papilomavirus (Cassonnet et al. 1998).

Mediante diagnóstico molecular, se han propuesto nueve especies de papilomavirus (Tabla 5). Además, por histopatología e IHQ, se han detectado papilomavirus en animales en libertad y de cautividad (Bossart et al., 2005; Rector et al., 2008) de numerosas especies de cetáceos odontocetos (Van Bressem et al. 1996) (Tabla 5).

Tabla 5. Listado de las especies de cetáceos en las cuales se ha detectado papilomavirus

Especie de cetáceo	Diagnóstico molecular	Nombre propuesto para la putativa especie viral	Referencia
<i>Delphinus capensis</i> (delfín común de pico largo)	No	nd	(Cassonnet et al., 1998; Van Bressem et al., 1996)
<i>Delphinus delphis</i> (delfín común)	No	nd	(Van Bressem et al., 2009a)
	Sí	DdPV1	(Gottschling et al. 2011)
<i>Lagenorhynchus acutus</i> (delfín atlántico de flancos blancos)	No	nd	(Geraci et al., 1987)
	Sí	TtPV3 variant	(Gottschling et al. 2011)
<i>Lagenorhynchus obscurus</i> (delfín oscuro)	No	nd	(Cassonnet et al., 1998; Van Bressem et al., 1996)
<i>Mesoplodon densirostris</i> (zifio de Blainville)	No	nd	(Flom et al., 1980)
<i>Monodon monoceros</i> (narval)	No	nd	(Geraci et al., 1987)
<i>Orcinus orca</i> (orca)	No	nd	(Geraci et al., 1987)
<i>Phocoena phocoena</i> (marsopa común)	No	nd	(Cassonnet et al., 1998; Geraci et al., 1987)
	Sí	PphPV1, PphPV2, PphPV3)	(Gottschling et al. 2011)
<i>Phocoena spinipinnis</i> (marsopa espinosa)	No	nd	(Van Bressem et al., 1996)
	Sí	PsPV1	(Rector et al., 2008; Van Bressem et al., 2007a)
<i>Physeter macrocephalus</i> (cachalote)	No	nd	(Lambertsen et al., 1987)
<i>Sotalia guianensis</i> (delfín costero)	No	nd	(Van Bressem et al., 2009a)
<i>Stenella coeruleoalba</i> (delfín listado)	No	nd	(Van Bressem et al., 2009a)
<i>Tursiops truncatus</i> (delfín mular)	No	nd	(Bossart et al., 2005; Cassonnet et al., 1998; Cruz et al., 2007; Van Bressem et al., 1996)
	Sí	TtPV1, TtPV2 y TtPV3	(Rector et al., 2008)

Diferentes estudios han detectado nueve posibles especies de papilomavirus : TtPV1, TtPV2, TtPV3: papilomavirus de *T. truncatus* respectivamente de tipo 1, 2 y 3; PsPV1: papilomavirus de *P. spinipinnis* de tipo 1; DdPV1 : papilomavirus de *D. delphis* ; TtPV3 variante : TtPV3 detectado en un *L. acutus* ; PphPV1, PphPV2, PphPV3 : papilomavirus de *P. phocoena* respectivamente de tipo 1, 2 y 3.

Se considera que los papilomavirus podrían producir efectos negativos en las poblaciones de cetáceos, debido a la aparición de papilomas genitales, que dificultasen e incluso impidiesen la cópula (Van Bressem et al. 1999). En efecto, se considera que varios de los procesos neoplásicos (cáncer urogenital, papilomas linguales, carcinomas de las células escamosas y papilomas genitales) (Newman & Smith 2006) de los cetáceos, podrían estar causados por nuevos agentes patógenos especie-específicos, como los papilomas de delfines (Rehtanz et al. 2006). Las lesiones son papilomas o fibropapilomas que son placas sin cambio de color que miden desde milímetros hasta 2 cm (Van Bressem et al. 1996).

IV Morbillivirus de cetáceo (CeMV)

Se ha puesto de manifiesto que el CeMV ha sido la causa primaria de varios varamientos masivos de cetáceos en el mundo entero (Van Bressem et al. 2001), reconociéndose por ello como el patógeno viral más potente de cetáceos (Duignan et al. 1995a).

IV.1 Etiopatogenia

IV.1.1 Clasificación

Hasta 1988, el género *Morbillivirus*, subfamilia *Paramyxovirinae*, familia *Paramyxoviridae* (ICTV 2002) se componía de cuatro especies, cada una específica de su hospedador: el virus del sarampión humano (*Measles virus*, MeV), el virus del moquillo canino (*Canine distemper virus*, CDV), el virus de la peste bovina (*Rinderpest virus*, RPV) y el virus de la peste de los pequeños rumiantes (*Peste-des-petits-ruminants virus*, PPRV). A partir de 1988, se detectaron morbillivirus en mamíferos marinos. El morbillivirus de la foca (*Phocine distemper virus*, PDV), el morbillivirus de la marsopa (porpoise morbillivirus, PMV) y el morbillivirus del delfín (dolphin morbillivirus, DMV) respectivamente hallados en pinnípedos (focas) y odontocetos (marsopas y delfines). En pinnípedos, el PDV se halló por primera vez en la especie *Phoca vitulina* (foca común) (Cosby et al. 1988, Kennedy et al. 1988b, Mahy et al. 1988, Osterhaus 1988, Osterhaus & Vedder 1988), de la familia *Phocidae*, superfamilia *Pinnipedia*, orden *Carnivora*. Y en cetáceos odontocetos, el PMV se halló por primera vez en la especie *P. phocoena* (Kennedy et al. 1988a), de la familia *Phocoenidae*, y el DMV en la especie *S. coeruleoalba* (Domingo et al. 1990), de la familia *Delphinidae*; ambas especies del suborden *Odontoceti*, orden *Cetacea*.

En 1994, Bolt et al. introdujeron el nombre de una nueva especie de morbillivirus : *Cetacean Morbillivirus*, que está reconocido en el comité internacional de taxonomía vírica (ICTV 2002).

El CeMV incluye cepas pertenecientes a tres grupos principales: el PMV (Kennedy et al. 1988a, McCullough et al. 1991, Visser et al. 1993), el DMV (Domingo et al. 1990, Barrett et al. 1993) y el morbillivirus del calderón (pilot whale morbillivirus, PWMV), hallado en un *Globicephala melas* (Taubenberger et al. 2000). Taubenberger et al. (2000), publicaron un árbol filogenético basado en el gen de la fosfoproteína (P), que es una región significativa del genoma de los morbillivirus para una correcta clasificación filogenética, y la cepa PWMV formaba un tercer clado dentro de CeMV (Figura 10). La información disponible a nivel genético y serológico pone en evidencia que los morbillivirus de cetáceos (PMV, DMV y PWMV) están más estrechamente relacionados con los morbillivirus de ruminantes (RPV y PPRV) que con los de carnívoros (PDV y CDV) (Figura 10) (Barrett et al. 1993, Visser et al. 1993, Blixenkrone-Moller et al. 1994, Blixenkrone-Moller et al. 1996, Haffar et al. 1999, Taubenberger et al. 2000).

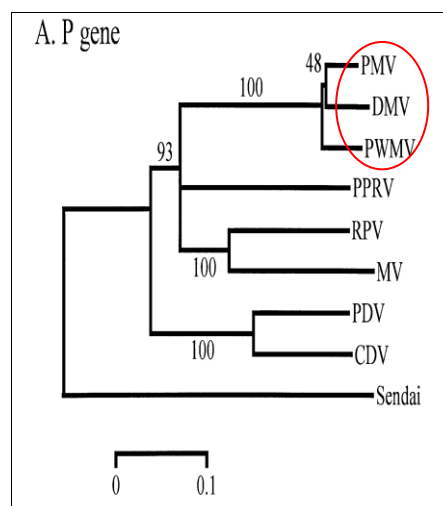


Figura 10. Árbol filogenético de las diferentes especies de CeMV

(Fuente: Taubenberger et al., 2000). Las diferentes especies de CeMV (*Cetacean morbillivirus*) son PMV (Porpoise morbillivirus), DMV (Dolphin morbillivirus) y PWMV (Pilot whale morbillivirus). Y las otras especies de morbillivirus se corresponden con PPRV (*Peste-des-petits-ruminants virus*) y RPV (*Rinderpest virus*) de ruminantes, MeV (*Measles virus*) de humanos, PDV (*Phocine distemper virus*) y CDV (*Canine distemper virus*) de carnívoros, siendo el virus Sendai una secuencia “outgroup” para enraizar el árbol filogenético.

Introducción

En cuanto a la taxonomía, es importante destacar que solamente el CeMV está reconocido oficialmente como especie de morbillivirus capaces de infectar especies de cetáceos (ICTV 2002). Ni DMV, ni PMV, ni PWMV son nombres oficialmente reconocidos.

Aparentemente, cada morbillivirus suele infectar hospedadores específicos de un único orden en condiciones naturales (Black 1991, Osterhaus et al. 1995); sin embargo, tanto en condiciones naturales como en condiciones experimentales, se ha demostrado que no se cumple esta premisa.

En condiciones naturales porque se ha demostrado que tanto CDV como PDV infectan especies del orden *Carnivora*, y en condiciones experimentales, porque el MeV puede infectar roedores, RPV conejos, PMV perros, DMV perros y CDV roedores (Tabla 6) (Osterhaus et al. 1995).

Lo que es importante subrayar, es que en pinnípedos (orden *Carnivora*, superfamilia *Pinnipedia*), además del PDV hallado en *P. vitulina*, se ha detectado el morbillivirus de la foca monje (monk seal morbillivirus, MSMV) en *Monachus monachus* (foca monje del Mediterráneo).

Este último virus, aunque afecte a pinnípedos, se observa que filogenéticamente se clasifica dentro de CeMV (Osterhaus et al. 1997, van de Bildt et al. 2000, van de Bildt et al. 2001), dejando abierta la hipótesis de que pueda existir, en condiciones naturales, transmisión de morbillivirus entre especies hospedadoras de diferentes ordenes (*Carnivora* / *Cetacea*), como en este caso la transmisión de CeMV entre *M. monachus* y especies de odontocetos (van de Bildt et al. 1999).

El MSMV debería ser considerado un miembro de CeMV (Figura 11) (van de Bildt et al. 2001).

Tabla 6. Especies hospedadores de las diferentes especies de morbillivirus en condiciones naturales y experimentales

Infección natural			Infección experimental	
	Especies domésticas	Especies salvajes	Especies domésticas	Especies salvajes
MeV	Humano Primates	(primates)	macaco tití ratón hámster rata	
RPV		(Africanos) (Asiáticos)		
	ganado bovino búfalo cerdo cabra / oveja	búfalo antílope eland jirafa kudú facóquero ñu	banteng antílope negro indio gaur nilgo sambar	ganado bovino conejo
PPRV	Cabra / oveja	Gacela cabra montés órice gacela	cabra ganado bovino cerdo	ciervo
PMV		marsopa	ganado bovino cabra / oveja perro	
DMV		delfines	ganado bovino cabra / oveja perro	
CDV	perro	<i>Canidae</i> (p.e. zorro) <i>Mustellidae</i> (p.e. hurón) <i>Procyonidae</i> (p.e. mapache) <i>Felidae</i> (p.e. león)	perro ratón rata / hámster visón cerdo gato	hurón
PDV		foca	perro hurón	foca

Adaptado de Osterhaus et al. (1995). PMV (porpoise morbillivirus) y DMV (dolphin morbillivirus) son grupos de cepas dentro de CeMV (*Cetacean morbillivirus*). Y las otras especies de morbillivirus se corresponden con PPRV (*Peste-des-petits-ruminants virus*) y RPV (*Rinderpest virus*) de rumiantes, MeV (*Measles virus*) de humanos, PDV (*Phocine distemper virus*) y CDV (*Canine distemper virus*) de carnívoros

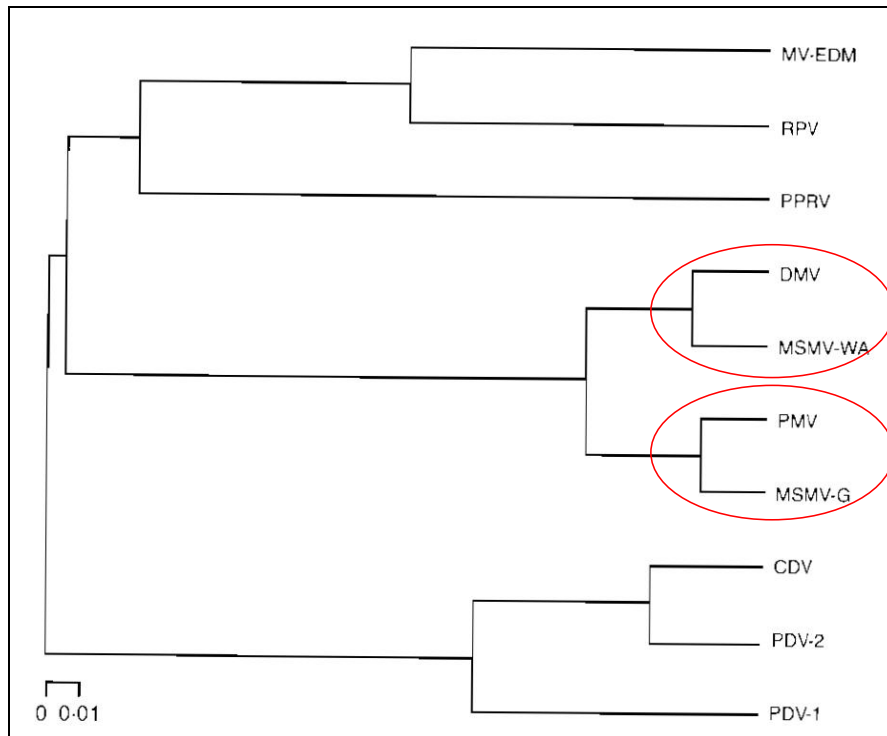


Figura 11. Relación filogenética de MSMV con CeMV

(Fuente: van de Bildt et al., 2000). Arbol filogenético basado en el gen de la fosfoproteína (gen P). MV-EDM, *Measles virus* cepa Edmonston; RPV, *Rinderpest virus*; PPRV, *Peste-des-petits-ruminants virus*; DMV, dolphin morbillivirus; MSMV-WA, monk seal morbillivirus-west Africa; PMV, porpoise morbillivirus; MSMV-G, monk seal morbillivirus-Greece; CDV, *Canine distemper virus*; PDV, *Phocine distemper virus*.

IV.1.2 Descripción del genoma

Los virus del género *Morbillivirus* son pleomórficos y envueltos, con un diámetro de 150 nm. El DMV responsable de la epizootia del Mar Mediterráneo de 1990-1992 es el único genoma secuenciado en su totalidad para todos los CeMV conocidos (número de acceso al GenBank AJ608288) (Rima et al. 2005). El genoma está formado por una molécula no segmentada de ARN de cadena sencilla (simple strand, ss) de polaridad negativa, de 15702 pares de bases (pb) (Rima et al. 2005). El morbillivirus tiene dos glicoproteínas de superficie integrales que son las proteínas de la hemaglutinina (hemagglutinin protein, H) y de la fusión (fusion protein, F) (Figura 12).

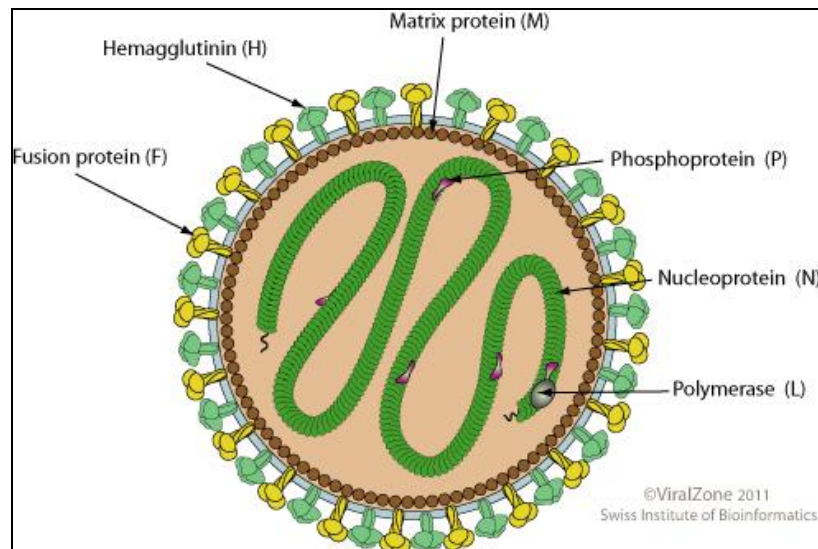


Figura 12. Esquema de una partícula viral de morbillivirus

(Fuente: http://education.expasy.org/images/Morbillivirus_virion.jpg). N, Nucleoprotein, nucleoproteína; P, phosphoprotein, fosfoproteína; M, matrix protein, proteína de la matriz; F, fusion protein, proteína de fusión; H, hemagglutinin protein, proteína de la hemaglutinina; L, large protein, proteína grande.

La F permite la penetración dentro de la célula, mientras que la H interactúa con el receptor celular (Meyer & Diallo 1995). La proteína de la matriz (matrix protein, M) es hidrofóbica, situada en el lado interno de la envuelta del virus y contiene residuos cargados positivamente que pueden estar involucrados en la interacción con el complejo ribonucleoproteico (ribonucleoprotein complex, RNP) (Rima et al. 2005). Este RNP contiene el genoma ARN ss, la polimerasa o proteína larga (large protein, L), la fosfoproteína (phosphoprotein, P) (Blixenkrone-Moller et al. 1996) y está encapsidado por la nucleoproteína (nucleoprotein, N). El orden de los genes desde el extremo 3' es: el gen N, el gen P que también codifica para las proteínas no estructurales C y V, el gen M, el gen F, el gen H y el gen L, cerca del extremo 5' (Blixenkrone-Moller et al. 1996), siendo proteínas estructurales las proteínas N, P, M, F, H y L (Rima et al. 2005).

IV.1.3 Patogenia, cuadro clínico y lesiones

Poco se conoce acerca de la patogenia y del cuadro clínico desencadenado por CeMV en cetáceos (Kennedy 2001). En los delfines, como en otras especies de mamíferos, las infecciones por morbillivirus tienen un patrón altamente linfotrópico, como se ha demostrado por la presencia frecuente del antígeno viral en los linfonódulos (Domingo et al. 1992).

Introducción

La extensa depleción linfoide y las altas concentraciones del antígeno viral en los linfonódulos sugiere que, como en otras especies, la infección produce una inmunosupresión grave y por consiguiente, una predisposición a infecciones secundarias (Domingo et al. 1992). Los cambios patológicos más frecuentes son neumonía y encefalitis, que varían de subagudas a crónicas (Domingo et al. 1992). En los odontocetos enfermos por IM se han reportado síntomas de letargia, disminución de la movilidad, flotación, descoordinación, taquicardia y taquipnea (Birkun et al. 1999, Kennedy 2001) así como tremor muscular (Piza 1991, Kennedy 1998) y suele observarse una condición corporal pobre (Domingo et al. 1992, Duignan et al. 1992). Se ha descrito que algunos animales chocan contra rocas o rompeolas, mientras que otros pierden el interés por nadar, posiblemente debido a las alteraciones cerebrales sufridas (Kennedy 1998). En *S. coeruleoalba* enfermos por morbillivirus, se ha observado un aumento de la carga en ectoparásitos en la piel y los dientes, hecho indicativo de la debilitación crónica sufrida por estos animales (Aguilar & Raga 1993, Kennedy 1998, Aznar et al. 2005).

Las lesiones presentes en las infecciones por morbillivirus son muy similares en los mamíferos terrestres y marinos (Kennedy et al. 1991, Domingo et al. 1992). Macroscópicamente, se observan lesiones en el aparato respiratorio y en el tracto digestivo superior. Muchos *Stenella coeruleoalba* varados en el Mediterráneo durante la epizootia de 1990, mostraron estomatitis ulcerativa y algunos presentaron estomatitis vesicular erosiva, con presencia de DMV en algunas úlceras (Domingo et al. 1992, Domingo et al. 2002). Otros miembros del género *Morbillivirus*, el RPV y el PPRV, causan erosiones en las membranas mucosas del tracto digestivo superior (Scott 1990a, b, Domingo et al. 2002).

Las lesiones microscópicas que se corresponden con meningoencefalitis no supurativa, neumonía y depleción linfoidea (Kennedy et al. 1991, Domingo et al. 1992, Duignan et al. 1992), no son específicas de IM (Domingo et al. 2002). Cada una de estas lesiones puede aparecer sola o en diferentes combinaciones (Domingo et al. 2002), y la concurrencia de las tres, forma una triada altamente presuntiva de una IM (Domingo et al. 2002).

Las lesiones histológicas son altamente características y muy similares a las de los mamíferos terrestres, con formación de sincitios (Domingo et al. 2002).

Los principales hallazgos microscópicos son: neumonía bronquiolo-intersticial, con inclusiones virales en el núcleo y citoplasma de las células sincitiales y mononucleares (Domingo et al. 1992).

También se puede observar encefalitis no supurativa con infiltración perivascular de tipo mononuclear y desmielinización (Domingo et al. 2002) (Figura 13).

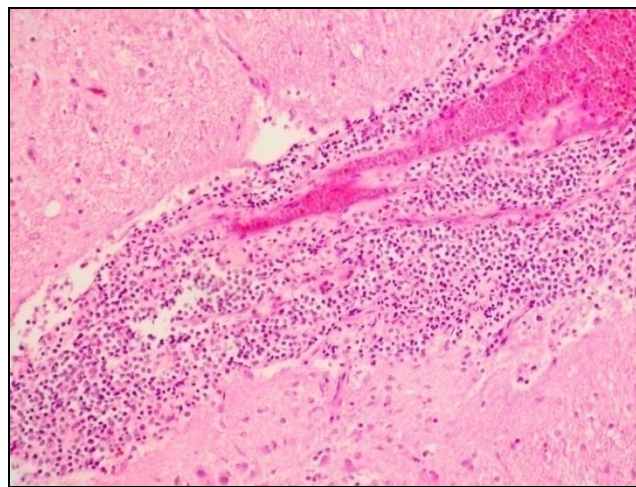


Figura 13. Encefalomyelitis no purulenta con manguitos perivascuales

Fuente: fotografía cedida por la ULPGC del encéfalo teñido con hematoxilina y eosina de un *G. machrorhynchus* varado en el archipiélago canario en 1996 enfermo por IM (Artículo 1, 2011)

Además de las lesiones pulmonares y encefálicas, la depleción linfoide completa la triada de las lesiones características de la IM.

Aunque macroscópicamente no se aprecie, las áreas corticales de los linfonódulos así como el bazo y el tejido linfoide asociado al intestino, están depleccionadas de linfocitos, que pueden ser reemplazados por grandes células sincitiales (Schulman et al. 1997, Domingo et al. 2002).

Se pueden observar cuerpos de inclusión intranucleares e intracitoplasmáticos eosinófilos en el pulmón, el encéfalo y el tejido linfoide (Domingo et al. 1990, Domingo et al. 1992, Domingo et al. 1995, Di Guardo et al. 2005).

Aunque los cuerpos de inclusión intranucleares e intracitoplásmicos, y los antígenos de morbillivirus son más comunes en el tejido pulmonar, en el sistema linfático (linfonódulos, bazo, timo y tejido linfoide asociado al intestino) y en el nervioso central, también se han identificado en el epitelio digestivo (lengua, farínge, esófago, estómago, intestino, conductos biliares), en el hígado y páncreas (células pancreáticas acinares), en el sistema urogenital (vejiga de la orina, pelvis renal, uréter, uretra peneana, prepucio, oviducto, vagina), y en el integumentario (piel, glándulas mamarias y lacrimales) (Schulman et al. 1997, Kennedy 1998).

IV.1.4 Excreción del virus, transmisión y epidemiología

Los mamíferos terrestres infectados por morbillivirus excretan grandes cantidades de virus. Además, la transmisión lateral por aerosol es común (Kennedy et al. 1991). Es probable que tal situación tenga lugar para las marsopas comunes (*Phocoena phocoena*) (Kennedy et al. 1991) y otros cetáceos.

En este sentido, la transmisión de CeMV probablemente se produzca a través de la inhalación de partículas virales en forma de aerosoles, expandido por individuos infectados, como en otros morbillivirus y probablemente favorecido por el comportamiento gregario de los animales (Black 1991, Van Bressem et al. 1999).

Por ejemplo, después de la infección, el virus CDV replica en los tejidos linfoides y se expande a otros tejidos mediante linfocitos infectados (Kennedy et al. 1991).

En un estudio realizado en *P. phocoena*, se observó necrosis del tejido linfoide y se han demostrado antígenos de morbillivirus en las células linfoides del bazo, en linfonódulos bronquiales, en pulmón y encéfalo, apoyando tal mecanismo (Kennedy et al. 1991). Las infecciones parasitarias graves en algunas *P. phocoena* podrían ser consecuencia de los efectos inmunosupresores de la IM (Kennedy et al. 1991).

Los estudios de distribución del antígeno morbillivirus en tejidos de cetáceos han sugerido que la excreción viral podría tener lugar por todos los orificios corporales y la piel (Kennedy et al. 1992a, Kennedy 1998).

Como los cetáceos no pasan ninguna parte de su vida en tierra y debido a que el virus excretado en el agua de mar será diluido y parcialmente o totalmente inactivado, la transmisión lateral a través de excreciones urinarias, fecales y dermales se considera poco probable, en contraste con la expansión por la vía de aerosoles.

La detección ocasional de antígenos virales en el tracto reproductivo masculino de una *P. phocoena* (Kennedy et al. 1992a) y del oviducto de un *T. truncatus* (Schulman et al. 1997), así como en las glándulas mamarias de *S. coeruleoalba* (Domingo et al. 1992) y de un *T. truncatus* (Schulman et al. 1997), sugieren, respectivamente, la posibilidad de transmisión lateral (venérea) y vertical (madre-cría) (Kennedy 1998).

Además, la presencia de ARN viral detectado mediante RT-PCR en una madre de *Globicephala melas* (calderón común) y en su feto (Fernández et al. 2008) indica que la transmisión transplacentaria de morbillivirus podría producirse en cetáceos.

Por otra parte, no se hallaron anticuerpos frente a DMV en el suero de un feto de una madre positiva (Van Bressem et al. 2001).

Al ser la placenta de los cetáceos de tipo epiteliocorial, es probable que las inmunoglobulinas sean transmitidas a la descendencia a través del calostro, como en el ganado vacuno y otros ungulados (Van Bressem et al. 2001).

Aunque la transmisión de morbillivirus por individuos portadores, por animales acuáticos inaparentemente infectados o por fómites, puede ser postulada, no existen evidencias directas que apoyan estas posibilidades (Kennedy 1998).

La transmisión interespecies, posiblemente facilitada por alteraciones en los patrones de migración, originada desde los *Globicephala* sp. en los cuales la IM podría ser enzoótica (Duignan et al. 1995b), se ha considerado como la forma más probable de transmisión (Kennedy 1998).

Los miembros del género *Morbillivirus* son virus altamente contagiosos, que frecuentemente causan enfermedad epizootica en poblaciones de hospedadores no expuestos previamente (Kennedy 1998).

Si se toma como ejemplo la población de *P. phocoena* en las costas de Inglaterra y Escocia, de un muestreo incluyendo 18 *P. phocoena* varadas en la costa de Inglaterra y 19 varadas en Escocia entre octubre de 1990 y junio de 1991, en ningún animal se detectó IM. Sin embargo, seis individuos varados en 1988 presentaron IM, así como dos individuos hallados en octubre y noviembre de 1990.

Todo ello podría indicar (1) que las *P. phocoena* de esta área geográfica tuviesen inmunidad protectora de por vida (Black 1991) y que la infección sea enzoótica con baja mortalidad, o bien (2) que la población no tenga inmunidad protectora pero que la transmisión lateral sea ineficiente, resultando en una baja mortalidad (Kennedy et al. 1992a).

En definitiva, es importante subrayar que cuando la transmisión se produce por contacto estrecho o por aerosoles, la densidad de la población se convierte en un factor determinante (Domingo et al. 2002).

IV.2 Tipos de CeMV implicados y su localización geográfica

Se expone un mapa en el que se representan solamente los episodios donde se ha caracterizado molecularmente el CeMV implicado (Figura 14). En cada uno de estos casos, cada tipo de CeMV se ha determinado mediante diagnóstico molecular y posterior análisis de las secuencias.

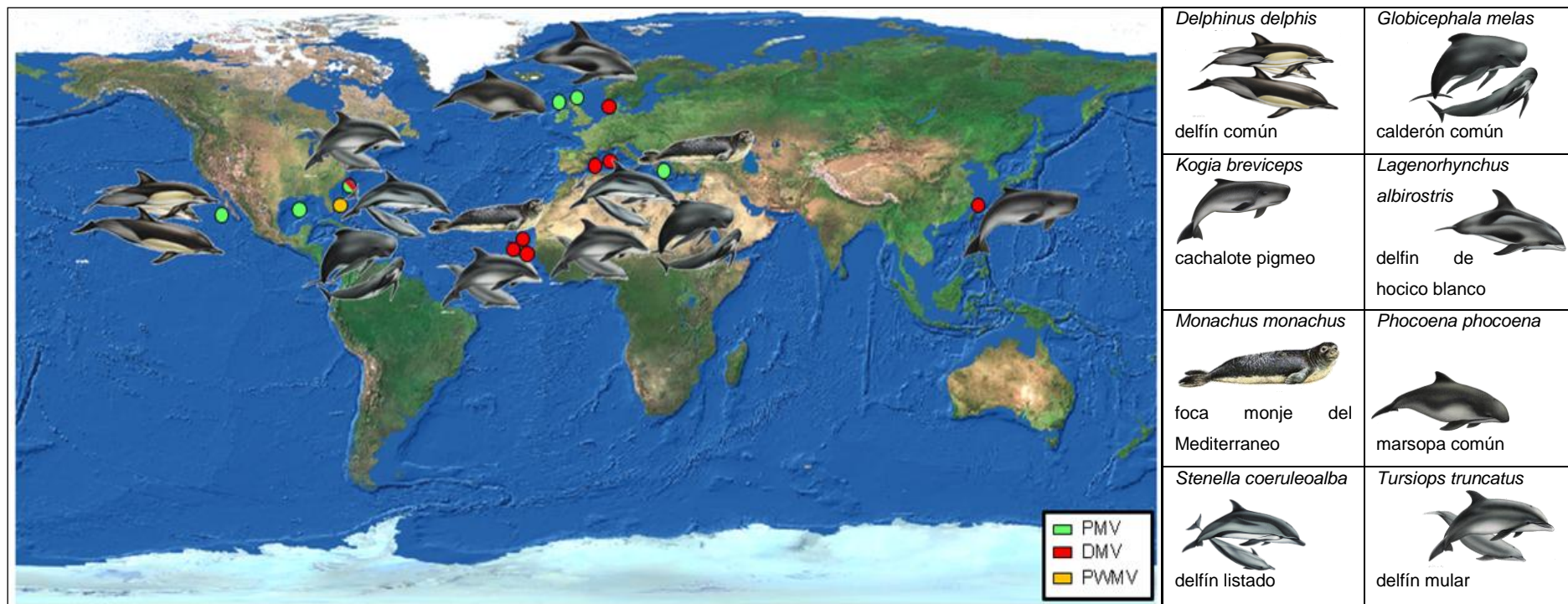


Figura 14. Situación geográfica de los diferentes tipos de CeMV detectados y caracterizados molecularmente

Fuente: siluetas de cetáceos (Culik 2004), silueta de *Monachus monachus* ⁵.

5

http://www.google.es/imgres?imgurl=http://marenostrum.org/vidamarina/animalia/mamiferos/pinnipedia/foca/pelaje1.jpg&imgrefurl=http://marenostrum.org/vidamarina/animalia/mamiferos/pinnipedia/foca/&usg=__73MyQa6x_XPF257yj-RMQG6af6c=&h=450&w=345&sz=32&hl=es&start=7&zoom=1&tbnid=i37PUX9Ar3qVFM:&tbnh=127&tbnw=97&ei=V_mLT8GiDcTT0QWNp4i-CQ&prev=/search%3Fq%3Dmonachus%2Bmonachus%2Bfoca%2Bmonje%2Bmauritania%26um%3D1%26hl%3Des%26sa%3DN%26gbv%3D2%26tbn%3Disch&um=1&itbs=1

IV.3 Episodios de varamientos masivos de cetáceos asociados a Infección por Morbillivirus (IM)

En las últimas décadas, se ha identificado la IM como primera causa de varios varamientos masivos de poblaciones de mamíferos marinos (Barrett et al. 1995, van de Bildt et al. 2000). Para entender la importancia de la virulencia de CeMV principalmente en los cetáceos odontocetos, a continuación, se procede a una reseña por orden cronológico de los principales episodios de varamientos donde se ha considerado como causa primaria la IM.

IV.3.1 Costa este de Estados Unidos (EEUU) (1982, 1986)

En este apartado, se pretende subrayar que, aunque se traten de varamientos donde no se ha detectado directamente el antígeno CeMV, sino que anticuerpos frente a morbillivirus, las serologías positivas demuestran que en los cetáceos del Atlántico oeste ya estaba circulando morbillivirus al menos desde 1982, es decir, unos seis años antes de que se registraran los episodios europeos de mortalidad por morbillivirus en *P. phocoena* (1988) y *S. coeruleoalba* (1990).

En el Atlántico oeste, Florida, en la primavera de 1982, aumentó la mortalidad de *T. truncatus* en comparación con otros años, registrándose casi 50 varamientos, una proporción significativa de la población residente (Duignan et al. 1996). Posteriormente, en un estudio serológico de animales vivos que tuvo lugar en verano de 1982, de seis *T. truncatus* muestreados, cinco (83,3 %) fueron seropositivos a morbillivirus. En este estudio serológico también se había muestreado 24 *T. truncatus* en 1980 (todos seronegativos), así como dos individuos de cuatro años de edad capturados en 1988 (también seronegativos). Debido a la seroconversión registrada en 1982, así como al incremento en la frecuencia de varamientos, Duignan et al. concluyeron que era altamente probable que estos animales hayan sido víctimas mortales de una IM (Duignan et al. 1996).

El mismo año (1982), pero más tarde (noviembre), y más al norte (cabo Cod – Massachusetts, EEUU), se registró el varamiento de un grupo de 66 *G. melas*, de los cuales, un único individuo fue muestreado. Se trataba de un individuo juvenil con serología positiva a morbillivirus. Su corta edad implicaba que la IM tenía que ser reciente (Duignan et al. 1995b).

Además, en la misma región geográfica (cabo Cod) pero cuatro años más tarde (diciembre 1986), otros dos varamientos masivos de *G. melas* tuvieron lugar, totalizando 58 animales, de los cuales 27 (47%) fueron seropositivos a anticuerpos frente a CeMV mediante la técnica de VN (Duignan et al. 1995b).

IV.3.2 Costa este de Estados Unidos (EEUU) (1987-1988): PMV y DMV

Entre junio 1987 y mayo 1988, se observó un varamiento masivo de 742 *T. truncatus*, en la costa este de EEUU, desde New Jersey a Florida. Se estimó que el 50% de la población residente de *T. truncatus* de la zona afectada había muerto. La investigación inicial concluyó que esta mortalidad fue causada por las brevitoxinas producidas por los dinoflagelados responsables de las mareas rojas, *Ptychodiscus brevis* (Lipscomb et al. 1994b).

A raíz de la identificación de nuevos morbillivirus (PDV, PMV y DMV) en mamíferos marinos en los años 1988-90 (Cosby et al. 1988, Kennedy et al. 1988a, Domingo et al. 1990), posteriormente (en 1996) se realizó un estudio retrospectivo en tejidos obtenidos de 79 *T. truncatus* que formaron parte del varamiento masivo que tuvo lugar en la costa este de EEUU en 1987-88 (Taubenberger et al. 1996). En este estudio retrospectivo molecular se usó la RT-PCR así como el análisis de las secuencias obtenidas, se demostró la presencia de PMV y DMV: en un *S. coeruleoabla*, se halló DMV, en 20 *T. truncatus* se halló PMV o DMV (11 con DMV y 9 con PMV), y en otros 4 *T. truncatus*, PMV y DMV simultáneamente (Taubenberger et al. 1996).

IV.3.3 Mar del Norte (1988-1990); costas de Irlanda, Inglaterra, Escocia y Holanda: PMV

En 1988, fue la primera vez que se demostró la presencia y el carácter patógeno de morbillivirus en cetáceos (Kennedy et al. 1988a). En seis *P. phocoena* varados en la costa irlandesa en 1988 entre septiembre y diciembre, se detectaron lesiones compatibles con IM, y se demostró la presencia del antígeno por MET, IHQ y aislamiento viral (Kennedy et al. 1988a, Kennedy et al. 1991, McCullough et al. 1991, Kennedy 1998).

Como primera hipótesis se sugirió una infección de estos animales por PDV, debido a la coincidencia en espacio y tiempo entre la puesta en evidencia de IM en *P. phocoena* y la grave epizootia por PDV (Kennedy et al. 1988a) que había causado la muerte de 18000 *P. vitulina*, en la misma área geográfica (noreste de Europa) y el mismo año (1988) (Dietz et al. 1989).

Más tarde, en 1990, la IM se identificó en dos *P. phocoena* varadas en las costas de Inglaterra y Escocia (Kennedy et al. 1992a), y dos en la costa holandesa (Visser et al. 1993).

Por medio de la caracterización molecular, se evidenció que se trataba de un nuevo morbillivirus (Barrett et al. 1993) y se le atribuyó el nombre de “morbillivirus de la marsopa” (Porpoise morbillivirus - PMV) (Kennedy et al. 1992a, Visser et al. 1993), por haber sido descubierto en esta especie de cetáceo (Kennedy et al. 1988a).

IV.3.4 Mar Mediterráneo (1990-1993): DMV

El CeMV que produjo el episodio de mayor mortalidad es el que azotó más de mil (Aguilar & Raga 1993) o incluso varios miles (Calzada et al. 1994) de *S. coeruleoalba* en el Mar Mediterráneo en 1990-1992. Se trataba de un nuevo CeMV, parecido al PMV pero lo bastante diferente como para que se le atribuyera otro nombre, el de “morbillivirus de delfín” (DMV) (Barrett et al. 1993).

Una primera fase de la epizootia tuvo lugar entre julio 1990 y el principio de 1991. Aunque se identificó que el origen de la epizootia fue a partir de julio de 1990 y en la costa valenciana, investigaciones más tardías confirmaron que un número pequeño de delfines murieron antes de julio de 1990 en las costas del sur de España, por lo que se emitió la hipótesis de que el virus tuviese su origen en el océano Atlántico, y de allí se haya introducido en el mar Mediterráneo (Domingo et al. 1992). Se produjeron varamientos masivos a lo largo de las costas mediterráneas españolas (Domingo et al. 1990), francesas (Bompar et al. 1991), italianas, argelinas y marroquíes (Van Bresse et al. 1991, Domingo et al. 1992, Aguilar & Raga 1993) hasta el estrecho de Gibraltar hacia el Atlántico (Van Bresse et al. 1991, Aguilar & Raga 1993).

En una segunda fase, entre junio y agosto 1991, fueron involucradas las costas italianas (Bortolotto et al. 1992) y griegas (Webb 1991, Van Bressem et al. 1993b).

Una tercera fase empezó en la primavera de 1992, desde las islas griegas, y aparentemente se extendió al este y noreste del Mar Mediterráneo (Figura 15) (Aguilar & Raga 1993).

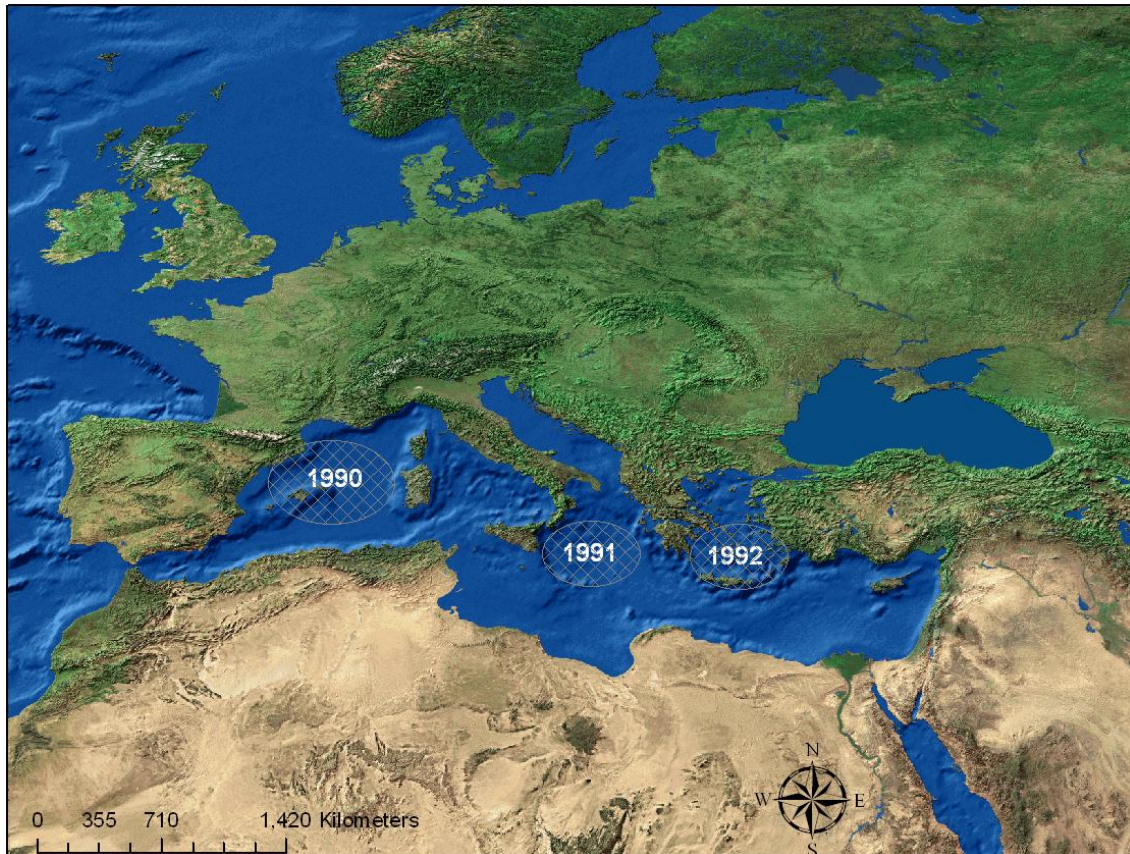


Figura 15. Áreas afectadas por los diferentes brotes epizooticos en el mar Mediterráneo entre 1990 y 1992.

(Mapa adaptado de un mapa publicado en : Aguilar and Raga, 1993)

Además, se ha detectado encefalitis por morbillivirus en dos *S. coeruleoalba* varados en la costa de Toscana (Italia) en 1993, así como anticuerpos neutralizantes anti-CDV en el suero de un *Balaenoptera acutorostrata* (rorcual aliblanco) varado en la misma costa en 1993. Estas dos observaciones sugieren que un morbillivirus idéntico o altamente relacionado ha estado circulando, hasta dos años después de 1991, en diferentes especies de cetáceos a lo largo de la costa italiana. Siendo ésta la primera descripción de IM en un cetáceo misticeto (Di Guardo et al. 1995).

IV.3.5 Golfo de Méjico (1993-1994); EEUU costas de Tejas, Misisipi, Alabama y Florida; PMV

De julio a noviembre 1993 en Alabama, de agosto a diciembre en Misisipi y de diciembre a abril 1994 en Tejas (Krafft et al. 1995, Lipscomb et al. 1996), se observó un incremento considerable de la mortalidad de *T. truncatus* (más de 50 individuos).

En los tejidos de los delfines afectados, los estudios histológicos mostraron lesiones compatibles con IM. Se detectó el antígeno por IHQ, así como molecularmente mediante amplificación parcial del gen P (Krafft et al. 1995, Lipscomb et al. 1996).

Las secuencias halladas en los pulmones de siete de siete individuos (100%) pertenecían a PMV, y se concluyó que había sido el agente causal del brote del golfo de Méjico (Taubenberger et al. 1996).

IV.3.6 Mar Negro (1994)

De mitad de julio a principios de septiembre de 1994, se registró la mortalidad de 26 *Delphinus delphis ponticus* (delfines comunes) en las costas de la península de Crimea (Ucrania) así como de otros 21 en otras partes de las costas del mar Negro (Rumania, Bulgaria, Ucrania y Rusia) (Birkun et al. 1999).

Las lesiones observadas, así como los resultados de IHQ, de MET así como de RT-PCR demostraron la presencia del antígeno morbillivirus. Debido a que no se secuenciaron los productos amplificados, se desconoce el tipo de CeMV.

Sin embargo, aunque el origen de este virus es desconocido, la localización y la fecha de aparición de dicho brote parecen indicar que proviene de los *S. coeruleoalba* del Mediterráneo que sufrieron la epizootia de DMV en 1990-1992.

El DMV que generó dicha epizootia tuvo su origen en el Mediterráneo oeste en 1990 y se propagó hacia el este hasta detectarse los últimos individuos en 1992 en las aguas griegas (Aguilar & Raga 1993).

De allí, el virus se pudo propagar a través del mar de Mármara al mar Negro, dando lugar a la epizootia de los *D. delphis* de 1994 (Figura 16). Además, los *S. coeruleoalba* y los *D. delphis* nadan juntos y este contacto podría permitir la transmisión del virus entre estas dos especies (Birkun et al. 1999).

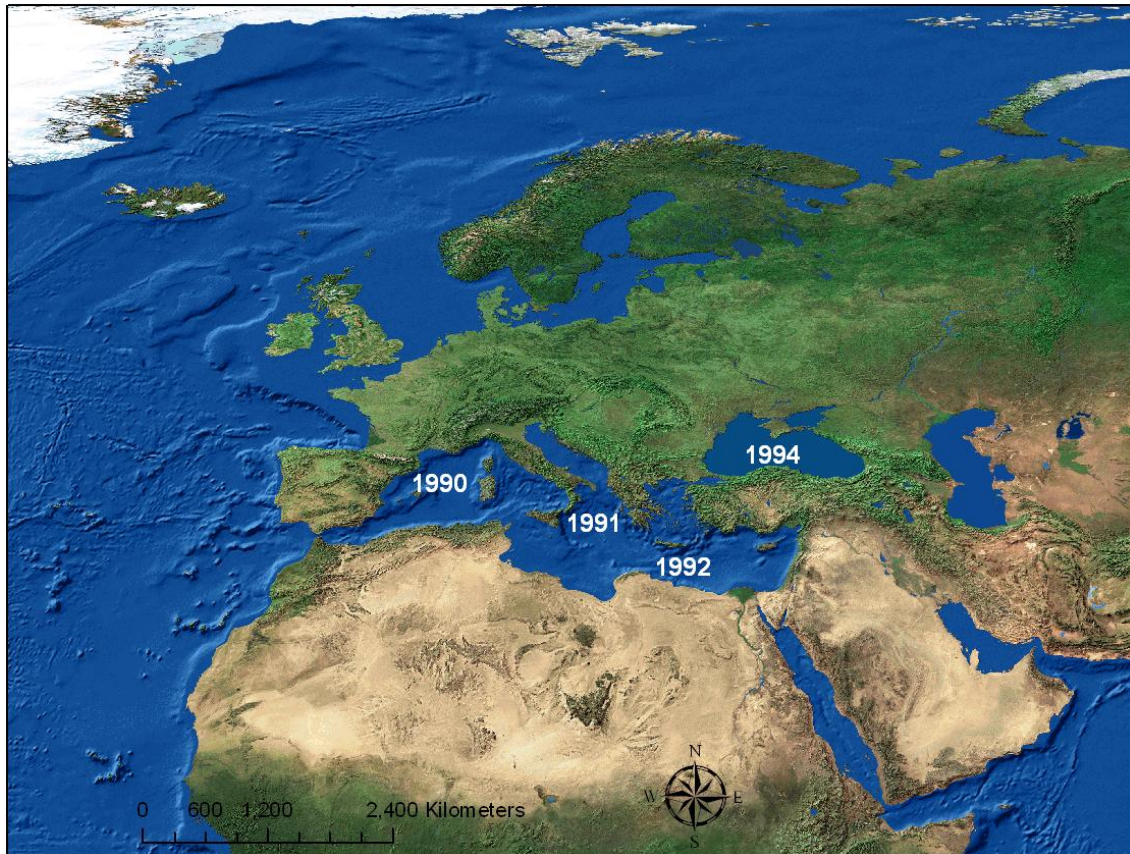


Figura 16. Mapa del escenario de Infección por Morbillivirus en el mar Mediterráneo y mar Negro entre 1990 y 1994

(Mapa adaptado de un mapa publicado en : Birkun et al., 1999).

IV.3.7 Costa de California (1995-1997); PMV

Se encontraron 18 *D. delphis* varados en las costas del sur de California entre agosto 1995 y agosto 1997 (Pacífico este). La detección de anticuerpos fue positiva en seis de seis (100%) individuos mediante VN y ELISA (Reidarson et al. 1998).

Los títulos de VN fueron negativos a CDV y PDV, ligeramente positivos a PMV y altamente positivos a DMV (Reidarson et al. 1998).

La detección molecular mediante RT-PCR del gen P (Barrett et al. 1993, Reidarson et al. 1998) fue positiva para tres de estos seis individuos (50 %) (Reidarson et al. 1998), y el análisis filogenético de las secuencias reveló que se trataba de PMV (Taubenberger et al. 2000).

IV.3.8 Mauritania (1997); ~ DMV

En las costas de Mauritania reside una población de *Monachus monachus* (foca monje del Mediterráneo), siendo el tamaño de la población residente de 270 animales. En 1997, se produjo un varamiento masivo de aproximadamente un 50% de la población total (Osterhaus et al. 1997). Los resultados del estudio no permitieron detectar lesiones compatibles con IM (Kennedy 1998), pero sí se consiguió aislar un morbillivirus que recibió el nombre putativo de “morbillivirus de la foca monje” (monk seal morbillivirus, MSMV), y cuya cepa es “MSMV – WA” (West Africa, del oeste africano). La cepa MSMV-WA es altamente similar a DMV (Figura 11) (Osterhaus et al. 1997) y debido a que se descartaron otros procesos, como los contaminantes antropogénicos, es probable que este morbillivirus fuese el agente causal de este varamiento masivo (van de Bildt et al. 1999).

IV.3.9 Mar Mediterráneo (2006-2008); DMV

Desde 1994, no se registraron más episodios de mortalidad causados por IM en el mar Mediterráneo, hasta 2006.

Después del patrón sistémico agudo de 1990 donde se demostró neumonía y encefalitis (Domingo et al. 1990), en seis *S. coeruleoalba* del Mediterráneo varados en la costa española entre 1990 y 1994 (en los años 1990, 1991, 1992 y 1994) se describió una infección crónica parecida a la panencefalitis esclerosante subaguda (subacute sclerosing panencephalitis, SSPE) que produce el MeV en humanos, sin lesiones extraneurales (Domingo et al. 1995). Además, un estudio serológico demostró que la seropositividad en *S. coeruleoalba* pasó del 100 % (N=24) en 1990-1992 a 50% (N=6) en 1997-99 (Van Bresse et al. 2001), y los autores concluyeron que el CeMV no parecía endémico en el mar Mediterráneo. Sin embargo, se desconoce la patogénesis de CeMV, y cabe la posibilidad de que el virus produzca, como en perros, una respuesta inmune humoral, títulos de anticuerpos neutralizantes y el desarrollo de una infección subclínica (Bossart et al. 2010).

Si la enfermedad por DMV pudiese dar lugar a infecciones subclínicas en los *S. coeruleoalba* del Mediterráneo, sería posible su conversión a hospedadores asintomáticos para DMV.

En 2006, por primera vez se describió DMV en *G. melas* (Fernández et al. 2008). Se inició una epizootía por DMV que duró hasta 2008, detectándose en *G. melas*, *S. coeruleoalba*, y *T. truncatus* varados en las costas mediterráneas españolas y francesas (Fernández et al. 2008, Raga et al. 2008, Keck et al. 2010). La epizootía empezó en el estrecho de Gibraltar y continuó a lo largo de las costas españolas mediterráneas desde octubre 2006 hasta abril 2007, causando la muerte de al menos 60 *G. melas* (Fernández et al. 2008, De Stephanis et al. 2009). Las lesiones fueron similares a las descritas previamente en otras especies, y el DMV se identificó por RT-PCR y secuenciación, siendo la secuencia muy similar a la del DMV que afectó los *S. coeruleoalba* en el brote de 1990-1992 (Fernández et al. 2008). En el estrecho de Gibraltar, mientras que la población de *G. melas* se considera estable, con un índice de crecimiento de 5,5% hasta 2006, durante el invierno 2006-07, una disminución de aproximadamente 15% se produjo debido a la epizootia por DMV (De Stephanis et al. 2009). Entonces, otro brote involucrando el varamiento masivo de más de 100 *S. coeruleoalba* empezó a principios de Julio 2007 hasta octubre, primero en el golfo de Valencia, pero se hallaron cadáveres de *S. coeruleoalba* también en las costas mediterráneas del sur de España, islas Baleares, Cataluña y mar de Liguria (Raga et al. 2008).

En las costas mediterráneas francesas, se registraron varamientos masivos entre agosto 2007 y marzo 2008, afectando más de 100 *S. coeruleoalba*, un *G. melas* y cinco *T. truncatus*. Individuos de estas tres especies fueron testados para la detección del gen P, y se obtuvo una secuencia 100% idéntica a la hallada en el brote español de 2006-2007 justo anterior (Keck et al. 2010).

En la reciente epidemia de 2006-2008, se observaron varamientos de *G. melas* de todas las edades, siendo la mayoría adultos (Fernández et al. 2008), lo que podría indicar que dicha especie en el mar Mediterráneo, nunca había estado en contacto con ese virus. Sin embargo, el DMV parece haber afectado *S. coeruleoalba* en su mayoría juveniles, y por tanto más jóvenes que los afectados en la epizootia de 1990-1992 (Raga et al. 2008, Keck et al. 2010).

Se pensó que las poblaciones de *S. coeruleoalba* presentaban algún recuerdo inmunológico de la epizootia de 1990 (Raga et al. 2008) ya que todos los morbillivirus inducen una inmunidad duradera en los hospedadores supervivientes (Black 1991).

IV.4 Casos aislados de animales varados con Infección por Morbillivirus (IM)

Además de los episodios de varamientos masivos por CeMV, se han descrito algunos casos aislados de animales enfermos por IM. En estos animales se ha podido (1) evidenciar IM por histopatología y serología, sin comprobación del agente causal por diagnóstico molecular, (2) detectar CeMV molecularmente sin poder asociar la IM con enfermedad, o bien (3) evidenciar enfermedad por IM junto con la caracterización molecular del morbillivirus implicado.

IV.4.1 Evidencia de lesiones compatibles con IM sin caracterización molecular del morbillivirus implicado

Una cría de *G. melas* con evidencia de enfermedad por IM se halló muerta en 1989 en el Atlántico este. Se detectó el antígeno mediante IHQ, así como lesiones compatibles mediante histopatología (Duignan et al. 1995b). En 1990, en un *Lagenorhynchus albirostris* (delfín de hocico blanco) varado en la costa alemana, se evidenció IM mediante detección del antígeno en el pulmón (Osterhaus et al. 1995). Previamente al brote del Golfo de México, en junio de 1993 varó un *T. truncatus* en la costa de Florida del golfo de México y se diagnosticó la IM por IHQ e histopatología (Lipscomb et al. 1994a). También se detectó el antígeno morbillivirus por IHQ, y solamente se pudo demostrar en un órgano, el encéfalo de un *T. truncatus* varado en 1994 en el mar Mediterráneo, en la costa de Israel (mar Mediterráneo) (Tsur et al. 1997).

En dos hembras *Balaenoptera physalus* (rorcual común) juveniles, una varada en noviembre 1997 en Bélgica (animal 1) (Jauniaux et al. 1998, Jauniaux et al. 2000), y la otra en octubre de 1998 en Francia (animal 2) se evidenciaron lesiones compatibles con enfermedad por IM. En los dos animales se detectó el antígeno morbillivirus mediante IHQ y se detectaron anticuerpos neutralizantes mediante VN (Jauniaux et al. 2000). Mediante MET, sólo se evidenció el antígeno en el animal 1 (Jauniaux et al. 1998, Jauniaux et al. 2000). Estos dos animales constituyen la primera prueba firme de IM en misticetos (Jauniaux et al. 1998, Jauniaux et al. 2000).

Y, finalmente, se han detectado lesiones compatibles con IM junto con evidencia del antígeno morbillivirus por IHQ en el encéfalo de un *Lagenorhynchus obliquidens* (delfín del pacífico de lados blancos) varado en 1998 en la costa pacífica de Japón (Uchida et al. 1999).

IV.4.2 Caracterización molecular del morbillivirus implicado pero sin evidencia de enfermedad por IM

En las costas griegas reside una población de *M. monachus*, y en un animal varado en 1996 se ha aislado en cultivo celular y detectado molecularmente el virus MSMV, cepa G (monk seal morbillivirus-Greece, MSMV – G). Este virus es altamente similar a PMV (Figura 11) (van de Bildt et al. 2000).

Después del varamiento masivo de *M. monachus* en las costas de Mauritania en 1997 donde se evidenció la presencia de MSMV-WA (cepa similar a DMV) (ver punto IV.3.8), al año, en 1998, en un *M. monachus* varado, se halla la cepa MSMV-98, y en un *T. truncatus* varado, la cepa DMV-98 ambos en Mauritania, y cuyo virus parecen cepas de DMV (van de Bildt et al. 2001).

IV.4.3 Evidencia de enfermedad por IM junto con caracterización molecular del morbillivirus implicado

En enero de 2007, un *Lagenorhynchus albirostris* (delfín de hocico blanco) se halla varado en la costa alemana del mar del Norte. Se hallan lesiones compatibles con enfermedad por IM así como una cepa de CeMV que comparte en el gen N y en el gen P, respectivamente 98 % y 99 % de similitud con la cepa DMV española de 1990 (Wohlsein et al. 2007).

Además, se han descrito otros casos, de los cuales se desconoce la fecha de varamiento. Estos casos se corresponden con dos individuos. El primer caso es un *Kogia breviceps* (cachalote pigmeo) varado en las costas de Taiwán, que se muere por enfermedad por IM y cuyo CeMV detectado es 97,6% similar a la cepa DMV española de 1990 en el gen P (Yang et al. 2006). El otro caso es un *G. melas* varado en la costa atlántica de EEUU (New Jersey). De este animal, mediante RT-PCR del gen N y del gen P, y posterior análisis filogenético, se identifica el ya mencionado PWMV (Taubenberger et al. 2000).

IV.5 Evidencia de IM en un amplio rango de hospedadores mediante técnicas serológicas

Se ha considerado interesante establecer una tabla que reuniese los casos descritos en los cuales la IM se ha demostrado mediante la detección de anticuerpos a través de técnicas como el iELISA, la VN o la neutralización por reducción de placa (Tabla 7). En la tabla 7 se puede apreciar que al menos 19 especies de cetáceos (17 especies de odontocetos y dos de mysticetos), han sufrido IM en condiciones naturales. Además del amplio número de especies, también es importante destacar que antes de 1988, año en que se evidenció el morbillivirus como agente patógeno de cetáceos en Europa (Kennedy et al. 1988a), varias especies de cetáceos odontocetos y mysticetos ya habían estado infectados por morbillivirus. En odontocetos, en particular individuos muestreados en la costa este de EEUU, por una parte de la especie *T. truncatus* en Florida en 1982 (Duignan et al. 1996), y por otra varios individuos de la especie *G. melas* en 1982 y 1986, en cabo Cod – Massachusetts (Duignan et al. 1995b) (ver apartado IV.3.1), y un *Feresa attenuata* (orca pigmea) en 1983 (Duignan et al. 1995a). En mysticetos, un *Balaenoptera physalus* en 1983 (Blixenkrone-Moller et al. 1996) (Tabla 7).

Es interesante subrayar que gracias a los estudios serológicos, se ha podido demostrar que otra especie diferente de *S. coeruleoalba* ha sido infectada por morbillivirus en el mar Mediterráneo a principios de la epizootia, se trata de un *D. delphis* varado en Cerdeña (Italia) en julio de 1990 (Van Bressem et al. 1993b) (Tabla 7).

Otros dos casos interesantes son dos *G. melas*, uno varado en 1991 y el otro en 1996, respectivamente adulto y juvenil, en las aguas inglesas, demostrándose que individuos de esta especie en el océano Atlántico noreste, han sufrido IM. El individuo varado en 1991 en Cleveland County (Inglaterra) tenía un título de anticuerpos en VN alto frente a PMV (Van Bressem et al. 1998a), mientras que el animal varado en 1996 en Cornwall (canal Inglés) tenía un alto título de anticuerpos específicos frente a DMV (Van Bressem et al. 1998a).

Cabe destacar que en el Atlántico la seroprevalencia de CeMV en los *Globicephala* sp. del océano Atlántico noroeste es del 86 % sin registros de varamientos masivos asociados a CeMV (Duignan et al. 1995b).

Además, también existe una alta seropositividad en el océano Pacífico suroeste (Nueva Zelanda), del 86 % de los individuos muestreados en 1997 (18/21) (Van Bressem et al. 2001). Estos altos porcentajes y las diferentes áreas geográficas donde se han hallado *G. melas* con IM, demuestran que el morbillivirus es endémico en calderones.

Además, debido a que son gregarios y se asocian con otras especies de cetáceos, podrían ser buenos candidatos a ser transmisores de la infección a otras especies de cetáceos (Van Bressem et al. 2001). Además, su número es suficiente en el Atlántico norte (778000) como para que sean reservorios de la infección (Van Bressem et al. 1998a). En cuanto al escenario mediterráneo, son habitualmente vistos junto con los *S. coeruleoabla* en el Mediterráneo oeste y el estrecho de Gibraltar, pudiendo formar grupos mixtos con ellos, y por ende, podrían constituir una vía de entrada del virus de la epizootia de 1990 (Van Bressem et al. 1998a).

Como reflexión general acerca de CeMV, es importante subrayar que la presencia de grupos de CeMV a través todo los océanos del mundo es un riesgo adicional para los cetáceos, particularmente para aquellos bajo presiones de actividades humanas, y deberían incluirse en los futuros intentos para modelar la sostenibilidad de las poblaciones de odontocetos y misticetos (Van Bressem et al. 2001).

Tabla 7. Especies de cetáceos con serologías positivas frente a morbillivirus

Género	Especie	Año/s	Área geográfica	Técnica	Nº positivos	Referencia
<i>Delphinus</i>	<i>D. capensis</i>	1993	Pacífico sureste (Perú)	iELISA	1	(Van Bressem et al., 1998b)
	<i>D. delphis</i>	1980-1992	Atlántico oeste	VN	4/11 (36%)	(Duignan et al., 1995a)
		1989-1992	Europa noroeste	VN	14/22 (64%)	(Visser et al., 1993)
		1990	Mar Mediterráneo (Italia)	iELISA y VN	1	(Van Bressem et al., 1993b)
		1992	Oeste del Reino Unido	iELISA y VN	1	(Van Bressem et al., 1998a)
		1993	Oeste del Reino Unido	iELISA y VN	1	(Van Bressem et al., 1998a)
		1994	Atlántico oeste	VN	6/10 (60%)	(Duignan et al., 1995a)
		1995-1999	Atlántico noroeste (Reino Unido)	iELISA y VN	1/19 (5%)	(Van Bressem et al., 2001)
		1999	Indico suroeste (Sudáfrica)	iELISA	1/8 (12,5%)	(Van Bressem et al., 2001)
	<i>D. delphis delphinus</i>	1993-1995	Pacífico sureste (Perú)	iELISA y VN	1	(Van Bressem et al., 1998b)
<i>Feresa</i>	<i>F. attenuata</i>	1983	Atlántico noroeste (EEUU)	VN	1/2 (50%)	(Duignan et al., 1995a)
<i>Globicephala</i>	<i>G. melas</i>	1982-1993	Atlántico noroeste (EEUU)	VN	92/100 (92 %)	(Duignan et al., 1995b)
		1991	Atlántico noreste (Inglaterra)	VN	1 (adulto)	(Van Bressem et al., 1998a)
		1996	Atlántico noreste (canal inglés)	iELISA y VN	1 (juvenil)	(Van Bressem et al., 1998a)
		1997	Pacífico suroeste (Nueva Zelanda)	Neutralización por reducción de placas	18/21 (86%)	(Van Bressem et al., 2001)
	<i>G. macrorhynchus</i>	1986-1994	Atlántico noroeste (EEUU)	VN	16/25 (64%)	(Duignan et al., 1995b)
<i>Grampus</i>	<i>G. griseus</i>	1992-93	Atlántico noroeste (EEUU)	VN	4/5 (80%)	(Duignan et al., 1995a)
		1997-1999	Mediterráneo oeste (España)	iELISA y VN	2/4 (50%)	(Van Bressem et al., 2001)
<i>Lagenodelphis</i>	<i>L. hosei</i>	1994	Atlántico noroeste (EEUU)	VN	11/23 (48%)	(Duignan et al., 1995a)
		1997, 1999	Atlántico suroeste (Brasil)	iELISA y VN	1/2 (50%)	(Van Bressem et al., 2001)
		1999	Atlántico suroeste (Argentina)	iELISA y VN	1/2 (50%)	(Van Bressem et al., 2001)
<i>Lagenorhynchus</i>	<i>L. albirostris</i>	1989-1992	Europa noroeste	VN	4/5 (80%)	(Visser et al., 1993)
		1995	Mar del Norte	iELISA	1	(Van Bressem et al., 1998a)
	<i>L. acutus</i>	1985-1993	Atlántico noroeste (EEUU)	VN	1/37 (3%)	(Duignan et al., 1995a)
	<i>L. obscurus</i>	1993-1995	Pacífico sureste (Perú)	iELISA y VN	6	(Van Bressem et al., 1998b)

Tabla 7 (cont.). Especies de cetáceos con serologías positivas frente a morbillivirus

Género	Especie	Año/s	Área geográfica	Técnica	Nº positivos	Referencia
<i>Pseudorca</i>	<i>P. crassidens</i>	1982-1988	Atlántico noroeste	VN	9/19 (47%)	(Duignan et al., 1995a)
<i>Stenella</i>	<i>S. coeruleoalba</i>	1991-1992	Mediterráneo (España, Italia, Grecia)	VN	14/14 (100%)	(Visser et al., 1993)
		1991-1993	Atlántico noroeste	VN	3/7 (43%)	(Duignan et al., 1995a)
		1997-1999	Mediterráneo oeste (España)	iELISA y VN	3/16 (19%)	(Van Bressem et al., 2001)
	<i>S. frontalis</i>	1993	Atlántico noroeste	VN	1/1 (100%)	(Duignan et al., 1995a)
<i>Tursiops</i>	<i>T. truncatus</i>	1980-1995	Atlántico noroeste (EEUU)	VN	54/219 (25%)	(Duignan et al., 1996)
		1993-1995	Pacífico sureste (Perú)	iELISA y VN	3	(Van Bressem et al., 1998b)
		1997, 1998	Mar Mediterráneo oeste (España)	iELISA y VN	1/2 (50%)	(Van Bressem et al., 2001)
		1997, 1998	Pacífico suroeste (Tasmania)	iELISA y VN	1/6 (17%)	(Van Bressem et al., 2001)
		1999	Mar del norte / canal (Reino Unido)	iELISA y VN	1/2 (50%)	(Van Bressem et al., 2001)
	<i>T. aduncus</i>	1999	Pacífico noroeste (Taiwan)	iELISA y VN	1/2 (50%)	(Van Bressem et al., 2001)
<i>Kogia</i>	<i>K. breviceps</i>	1983-1991	Atlántico noroeste (EEUU)	VN	1/19 (5%)	(Duignan et al., 1995a)
<i>Phocoena</i>	<i>P. phocoena</i>	1989-1992	Europa noroeste	VN	15/37 (41%)	(Visser et al., 1993)
		1991-1995	Atlántico noreste	iELISA y VN	9	(Van Bressem et al., 1998a)
		1993	Atlántico noroeste (EEUU)	VN	9/28 (32%)	(Duignan et al., 1995a)
		1994	Atlántico noroeste (EEUU)	VN	1/15 (7%)	(Duignan et al., 1995a)
		1995-1999	Atlántico noreste (Reino Unido)	iELISA y VN	3/116 (3%)	(Van Bressem et al., 2001)
<i>Balaenoptera</i>	<i>B. acutorostrata</i>	1993	Mediterráneo (Italia)	VN	1 (adulto)	(Di Guardo et al., 1995)
	<i>B. physalus</i>	1983	Aguas de Islandia	VN	13/48 (27%)	(Blixenkrone-Moller et al., 1996)

V Herpesvirus de cetáceos (HV)

V.1 Clasificación

Los miembros de la familia *Herpesviridae* tienen un tamaño que varia desde 120 hasta 300 nm. Son virus con envuelta, tegumento, cápside icosaédrica y un core que contiene el genoma que es una doble cadena lineal de ADN de 130 a 235 kpb (kilo pares de bases) (Figura 17).

Los herpesvirus (HV) han sido clasificados por el grupo de estudio de Herpesvirus del Comité Internacional sobre Taxonomía de Virus (Herpesvirus Study Group of the International Committee on the Taxonomy of Viruses, ICTV) en tres subfamilias: *alphaherpesvirinae* (α -HV), *betaherpesvirinae* (β -HV) y *gammaherpesvirinae* (γ -HV) en base a propiedades biológicas.

Son virus muy diseminados que afectan la mayoría de las especies animales, y tienen la característica de poder permanecer en estado latente en el núcleo de la célula infectada (Roizmann & Pellett 2001).

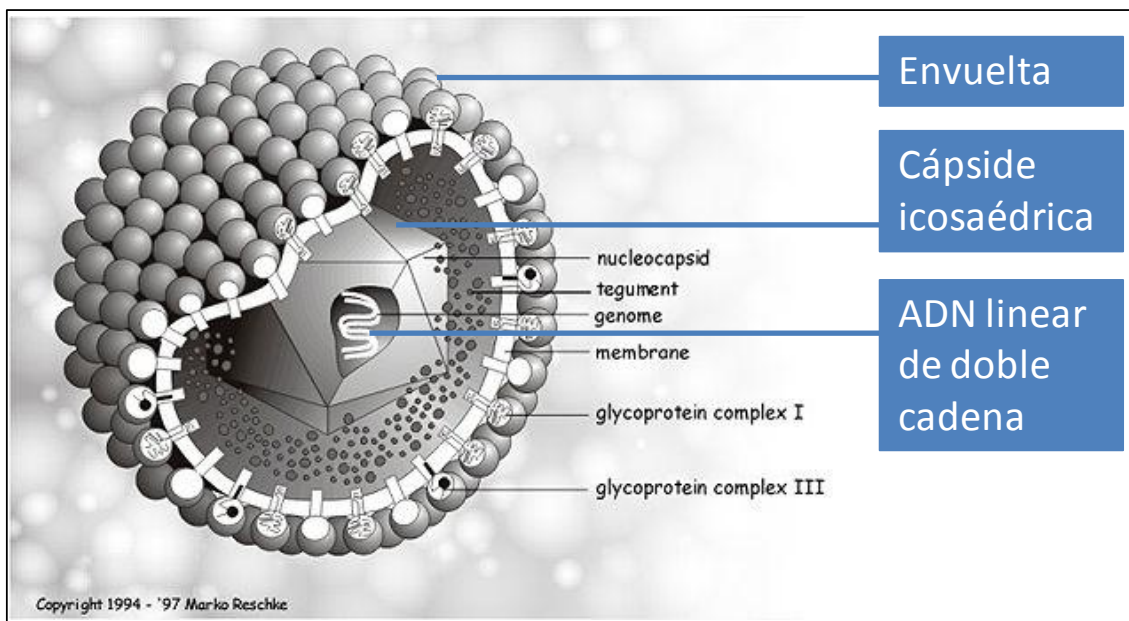


Figura 17. Esquema de una partícula viral de herpesvirus (*Human Herpesvirus 5*).

(Fuente: human cytomegalovirus study group y Dr. Marko Reschke en Marburg, Alemania).

Es muy importante resaltar que el término “Herpesvirus” no se refiere a una especie viral, sino que a cualquier virus de la familia “*Herpesviridae*”, ya sea de la sub-familia α -HV, β -HV o γ -HV, y dentro de cada una, hay diferentes géneros, por ejemplo, dentro de α -HV están los géneros: *Simplexvirus*, *Varicellovirus*, *Mardivirus* e *Iltovirus*; y dentro de cada género, sus especies, por ejemplo dentro del género *Simplexvirus*, las especies: *Human herpesvirus 1*, *Bovine herpesvirus 2*, *Cercopithecine herpesvirus 1* (McGeoch et al. 2006).

En concordancia con la nomenclatura actual del ICTV, todos los herpesvirus se designan según el nombre de la familia (en la mayoría de los casos) o nombre de la subfamilia (para primates y animales domésticos) del hospedador natural del virus, seguido de un número árabe en serie, por ejemplo HHV-1 (*Human Herpesvirus 1*), HHV-2 o HHV-3.

Ninguna especie de HV de cetáceo está reconocida por el ICTV hasta la fecha, y generalmente los autores proponen nombres a los virus acorde con la especie en la que se ha hallado la secuencia por primera vez.

V.2 Casos descritos en cetáceos

Los herpesvirus son virus ampliamente distribuidos que afectan la mayoría de las especies animales (Roizmann et al. 1992).

Anteriormente, los métodos de diagnóstico de herpesvirus en cetáceos se basaban mayoritariamente en las lesiones, la histopatología, la IHQ (Mikaelian et al. 1999) y la MET (Martineau y col., 1988; Van Bressem y col., 1994).

Mediante estos métodos se han asociado diferentes cuadros por herpes o “herpes – like” en cetáceos: dermatitis en un *Delphinapterus leucas* (belugas) (Martineau et al. 1988, Barr et al. 1989), así como dermatitis y encefalitis en un *P. phocoena* (Kennedy et al. 1992b). Este último caso se detectó por histopatología e IHQ, sin que se llevase a cabo ningún diagnóstico molecular, por lo que se desconoce dónde se clasificaría el virus implicado.

Introducción

Ultimamente, el estudio molecular para la detección de HV, cuyas secuencias se han descrito en animales muy diferentes en la escala zoológica, desde reptiles a mamíferos, está en auge, también en el campo de cetáceos, como herramienta para establecer el análisis filogenético de los aislados.

Para ello, se desarrolló una PCR universal que amplifica una región del gen de la polimerasa (VanDevanter et al. 1996) (Protocolo 5). Para obtener una mejor clasificación de las secuencias obtenidas de esta región en concreto, es aconsejable traducir la secuencias de nucleótidos a aminoácidos (McGeoch et al. 2006).

Con el uso de esa PCR universal se están descubriendo continuamente nuevas secuencias de HV en cetáceos de todo el mundo. Sin embargo, se ignora la verdadera repercusión que estos virus puedan tener en las poblaciones de cetáceos.

Hallazgos anatomopatológicos y moleculares han demostrado la existencia de dos nuevas secuencias de α -herpesvirus detectadas en dos *T. truncatus* con infecciones sistémicas (Blanchard et al. 2001).

También se han hallado nuevas secuencias de α -HV en lesiones de piel de *T. truncatus* (Manire et al. 2006, Smolarek Benson et al. 2006) (Tabla 8), así como nuevas secuencias de γ -HV en lesiones genitales de *Mesoplodon densirostris* (zifio de Blainville), *T. truncatus*, *Kogia sima* (cachalote enano) y *Grampus griseus* (calderón gris) (Saliki et al. 2006, Smolarek Benson et al. 2006, van Elk et al. 2009) (Tabla 9).

En resumen, las infecciones por herpesvirus parecen comunes en cetáceos aunque su poder patógeno parece reducido ya que solamente se han descrito como agente causal de tres cuadros sistémicos mortales.

En una marsopa común (*Phocoena phocoena*), no se dispone de caracterización molecular (Kennedy et al. 1992b), y en dos delfines mulares (*Tursiops truncatus*), se han denominado putativamente herpesvirus de delfin 1 (dolphin HV-1) y 2 (dolphin HV-2) (Blanchard et al. 2001).

Tabla 8. Listado de las secuencias nucleotídicas de alpha-HV halladas hasta 2010

Nº GenBank (Referencia)	Especie	País (Área)	Origen	Año	Patología	Nombre del virus
ALPHAHERPESVIRUS						
AF196646 (Blanchard et al., 2001)	<i>Tursiops truncatus</i>	EEUU (costa atlántica)	Varado	1995	Infección sistémica (sistema linfático, pulmón)	Bottlenose dolphin herpesvirus (1)
AF245443 (Blanchard et al., 2001)	<i>Tursiops truncatus</i>	EEUU (costa atlántica)	Varado	1999	Infección sistémica (pulmón, corazón)	Bottlenose dolphin herpesvirus (2)
AY757301 (Manire et al., 2006; Smolarek Benson et al., 2006)	<i>Tursiops truncatus</i>	EEUU Florida / Florida	Capturado / Cautividad	2004	Dermatitis	Bottlenose dolphin herpesvirus (3)
AY949832 (Smolarek Benson et al., 2006)	<i>Tursiops truncatus</i>	EEUU	Cautividad	(2001-2005)	Lesión de piel	Bottlenose dolphin herpesvirus (4)
AY608707 (Smolarek Benson et al., 2006)	<i>Tursiops truncatus</i>	Alemania	Cautividad	2001	Lesión piel	<i>Tursiops truncatus</i> alphaherpesvirus 1
DQ295063 (Smolarek Benson et al., 2006)						<i>Tursiops truncatus</i> alphaherpesvirus 2
DQ295064 (Smolarek Benson et al., 2006)						<i>Tursiops truncatus</i> alphaherpesvirus 3

Tabla 9 Listado de las secuencias nucleotídicas de gamma-HV halladas hasta 2010

Nº GenBank (Referencia)	Especie	País (Área)	Origen	Año	Patología	Nombre del virus
GAMMAHERPESVIRUS						
AY803337 (Saliki et al., 2006)	<i>Mesoplodon densirostris</i>	EEUU (costa atlántica)	Varado	2004	Lesión peneana	Blainville's beaked whale gammaherpesvirus (1)
AY952779 (Smolarek Benson et al., 2006)	<i>Tursiops truncatus</i>	EEUU (costa atlántica)	Varado	(2001-2005)	Lesión lingual	Bottlenose dolphin herpesvirus (5)
AY952778 (Smolarek Benson et al., 2006)					Lesión peneana	
AY949828 (Smolarek Benson et al., 2006)	<i>Mesoplodon densirostris</i>	EEUU (costa atlántica)	Varado	(2001-2005)	Lesión peneana	Blainville's beaked whale gammaherpesvirus (2)
AY949830 (Smolarek Benson et al., 2006)	<i>Kogia sima</i>	EEUU	Desconocido	(2001-2005)	Lesión vaginal	Dwarf sperm whale gammaherpesvirus
AY949831 (Smolarek Benson et al., 2006)	<i>Tursiops truncatus</i>	EEUU	Cautividad	(2001-2005)	Lesión peneana	Bottlenose dolphin gammaherpesvirus
AY952776 (Smolarek Benson et al., 2006)	<i>Tursiops truncatus</i>	EEUU (costa atlántica)	Varado	(2001-2005)	Lesión peneana	Atlantic bottlenose dolphin gammaherpesvirus (2)
AY952777 (Smolarek Benson et al., 2006)	<i>Tursiops truncatus</i>	EEUU	Cautividad	(2001-2005)	Lesión vaginal	Bottlenose dolphin herpesvirus (6)
DQ288666 (Smolarek Benson et al., 2006)	<i>Grampus griseus</i>	EEUU (costa atlántica)	Varado	2005	Lesión vaginal	Risso's dolphin gammaherpesvirus
DQ288667 (Smolarek Benson et al., 2006)	<i>Tursiops truncatus</i>	EEUU (costa atlántica)	Varado	2004	Lesión peneana	Atlantic bottlenose dolphin gammaherpesvirus (1)
GQ258353 (van Elk et al., 2009)	<i>Tursiops truncatus</i>	Holanda	Cautividad	2008	Lesión peneana	Bottlenose dolphin herpesvirus (7)
GQ258354 (van Elk et al., 2009)	<i>Tursiops truncatus</i>	EEUU (golfo Méjico) / Holanda	Capturado / Cautividad	2008	Lesión peneana	Bottlenose dolphin herpesvirus (8)
GQ258355 (van Elk et al., 2009)	<i>Tursiops truncatus</i>	EEUU (golfo Méjico) / Holanda	Capturado / Cautividad	2008	Lesión vaginal	Bottlenose dolphin herpesvirus (9)
GQ258356 (van Elk et al., 2009)	<i>Tursiops truncatus</i>	Cuba / Holanda	Capturado / Cautividad	2008	Lesión peneana	Bottlenose dolphin herpesvirus (10)

JUSTIFICACION Y OBJETIVOS



I Justificación

I.1 Problemáticas “actuales”

I.1.1 Morbillivirus de cetáceo (CeMV)

El CeMV es un virus que ha producido varias epizootias en el mundo entero. En un estudio que ha demostrado que existe alta seroprevalencia frente a CeMV en calderones (*Globicephala* sp.), se emitió la hipótesis de que podían desempeñar un papel como reservorios del CeMV para otras especies de cetáceos (Duignan et al. 1995b). Esta hipótesis ha sido referenciada en al menos 14 ocasiones (Barrett et al. 1995, Duignan et al. 1995c, Blixenkrone-Moller et al. 1996, Taubenberger et al. 1996, Kennedy 1998, Mikaelian et al. 1999, Van Bressem et al. 1999, Nielsen et al. 2000, Taubenberger et al. 2000, Kennedy 2001, Van Bressem et al. 2001, Domingo et al. 2002, Smolarek Benson 2005, Van Bressem et al. 2009a); sin embargo, no existen estudios moleculares en estas especies y esta zona geográfica. Como consecuencia, se desconoce si están involucradas cepas de PMV o de DMV.

Los varamientos masivos en aguas europeas de 1988 (Mar del Norte) y 1990 (Mar Mediterráneo), llevaron a Duignan et al. (1995) a realizar un estudio serológico retrospectivo mediante inmunohistoquímica (IHQ) y seroneutralización (SN) en ambas especies de calderones (*Globicephala melas* y *Globicephala macrorhynchus*) varados entre 1982 y 1994 en el Atlántico norte occidental (EEUU). En su estudio, se demuestra que la infección por morbillivirus estaba muy extendida en las poblaciones de ambas especies y en ese lugar. Las altas seroprevalencias frente a CeMV (86%) observadas en todas las edades, tanto en animales varados como en los no varados, sugieren una infección enzoótica. Además, se evidenció enfermedad clínica en un joven *G. melas* varado en 1989, confirmando la patogenicidad del virus para individuos carentes de protección inmunológica adecuada. Desafortunadamente, no se identificó molecularmente el CeMV implicado. Las altas seroprevalencias indicaron que los calderones están en continuo contacto con el virus, y que un número suficiente de ellos son inmunes, impidiendo que se produzcan brotes graves por esta enfermedad (Duignan et al., 1995).

Es necesario informar que en el año 1995, sólo se conocían PMV y DMV dentro de los CeMV. Posteriormente, se identificó molecularmente por primera vez un morbillivirus en una especie de calderón, concretamente en un calderón común (*Globicephala melas*) varado en la costa atlántica de EEUU (Taubenberger et al. 2000), con lesiones compatibles con infección por morbillivirus. La secuencia observada era nueva, y se denominó PWMV. Este es el único estudio molecular en las especies de calderones de este área que demuestra la existencia de un CeMV, en este caso, un PWMV.

Por todo lo expuesto anteriormente, es fundamental incrementar los estudios de caracterización molecular de morbillivirus en las especies de calderones (Duignan et al. 1995b, Taubenberger et al. 2000). De esta forma, se podría determinar si el PWMV o cepas afines son responsables de las altas seroprevalencias registradas en calderones, o si por el contrario, hay una mayor representación de los ya mejor conocidos PMV y DMV.

En caso de que los calderones fueran portadores de PMV y DMV, es posible que actuaran como vectores de morbillivirus hacia otros cetáceos del Atlántico norte y del Mediterráneo (Van Bressem et al. 1998a, Van Bressem et al. 1999). Y, si el CeMV no se mantuviese en el Mediterráneo, cabría la posibilidad de que ocurriera una nueva epizootia cuando emergiera una nueva infección con individuos susceptibles.

En 1990-1992, se produjo un brote por DMV en el Mediterráneo occidental que implicó la muerte de varios miles de delfines listados (*Stenella coeruleoalba*). En 2006 (catorce años después del último brote del Mediterráneo), se registró un nuevo episodio de mortalidad masiva por DMV en el Mediterráneo occidental que empezó afectando, por primera vez en el Mediterráneo, al calderón común (*G. melas*), solapándose en 2007 con un epizootia que afectó también al delfín listado (*S. coeruleoalba*) (Fernández et al. 2008, Raga et al. 2008). Hasta la fecha, se ha descrito que los DMV responsables de la muerte de *G. melas* y *S. coeruleoalba* en el reciente brote del Mediterráneo parecían idénticos entre sí (Keck et al. 2010), y muy similares al que afectó los *S. coeruleoalba* en 1990-1992 (Fernández et al. 2008). Por todo ello, también se pretende utilizar métodos moleculares para averiguar la relación filogenética que existe entre las cepas detectadas en *G. melas* y *S. coeruleoalba* de DMV de 2007, así como su relación con el DMV de 1990 para averiguar si el origen podría ser éste.

I.1.2 Hespervirus de cetáceos (HV)

Los HV están ampliamente distribuidos y han sido considerados como agente causal primario de infecciones sistémicas seguidas de muerte, en al menos tres individuos. Aunque la tasa de mortalidad registrada por estos virus es muy inferior a la descrita para CeMV, es importante su detección y caracterización genética, ya que existe un gran desconocimiento acerca del papel que juegan los HV en el estado de salud de las distintas poblaciones de cetáceos. Las técnicas moleculares, por su alta sensibilidad, presentan la ventaja de permitir la detección de animales portadores asintomáticos, y así poder utilizarlos como marcadores biológicos de población.

Los estudios moleculares en el pasado se centraron en muestras de animales varados (Saliki et al. 2006, Smolarek Benson et al. 2006) o de animales que vivían en cautividad (Manire et al. 2006, Smolarek Benson et al. 2006, van Elk et al. 2009), pero todos ellos originarios de las costas Atlánticas de EEUU, Golfo de Méjico y Cuba (Tabla 8 y Tabla 9). En Europa se han descrito dos casos, en una marsopa común (*Phocoena phocoena*) varada en la costa de Suecia (Kennedy et al. 1992b) y en un delfín mular (*Tursiops truncatus*) varado en el archipiélago Canario (Esperón et al. 2008). Sin embargo, en el primer caso no se caracterizó molecularmente el virus y en el segundo caso, la secuencia hallada era altamente compatible con HHV-1, pudiendo tratarse de una infección accidental de un herpesvirus humano en un cetáceo.

En definitiva, hasta 2010, no se ha descrito ninguna secuencia compatible con HV de cetáceo en aguas europeas, y más particularmente, en aguas españolas.

I.2 Los bancos de tejidos como medio para estudiar el status sanitario de los cetáceos

Los varamientos de los cetáceos en las costas son los efectos visibles de varios factores que amenazan la supervivencia de estos animales. Esta tesis pretende contribuir al estudio de las enfermedades de origen vírico de mayor gravedad para los cetáceos, y más concretamente, hacia la caracterización molecular de nuevas secuencias de morbillivirus y herpesvirus.

Debido a que el Archipiélago Canario es una región privilegiada por la abundancia y diversidad de cetáceos que habitan sus aguas, es un excelente lugar para estudiar problemas sanitarios del océano Atlántico, y de las costas españolas en particular.

Por otra parte, el mar Mediterráneo constituye un área geográfica de estudio obligado para CeMV debido fundamentalmente a las dos epizootias, la de 1990-1992, y la de 2006-2008, que ocurrieron en las costas españolas.

Los tejidos de animales varados, tanto individualmente, como colectivamente durante los distintos brotes, constituyen la base de un banco de tejidos.

Se dispone de un importante número de muestras del banco de tejidos cedidos amablemente por la Universidad de Las Palmas de Gran Canarias (ULPGC), concretamente por el Departamento de Morfología de la Facultad de Veterinaria, Instituto de Sanidad Animal. Estos tejidos provienen de individuos varados entre 1996 y 2011 en la Macaronesia, principalmente en el archipiélago Canario. Está formado por 406 tejidos provenientes de 75 individuos.

Este banco de tejidos ha servido previamente para la realización de dos tesis doctorales en nuestro grupo, una sobre la presencia de contaminantes antropogénicos (Esperón 2005) y, la otra, sobre el efecto de dichos contaminantes en el sistema inmune de los cetáceos (Cámara 2007).

Además, para la presente Tesis, se ha dispuesto de muestras que se han ido obteniendo del diagnóstico de la epidemia de CeMV de 2007, concretamente, de 185 órganos provenientes de 40 individuos varados en el Mediterráneo español durante 2006, 2007 y 2009 (muestras cedidas por las siguientes entidades: (1) CRFS "El Valle", Murcia, Fernando Bayón; (2) Marineland Mallorca y (3) SOS Fauna marina "Promar"-Almería).

De todas estas muestras se realizó un rastreo sistemático de CeMV y HV, tanto en animales con lesiones como sin ellas.

Como resultado de estos estudios se han realizado cuatro artículos científicos que se han incluido en el documento que forma esta Tesis.

II Objetivos

Debido a las problemáticas actuales de CeMV y HV en el mar Mediterráneo y en el océano Atlántico y a la necesidad de hacer avances en la investigación de estos virus con la aportación de muestras provenientes de cetáceos varados de estas dos áreas geográficas, se plantean los siguientes objetivos:

1. Detectar y caracterizar molecularmente cepas de morbillivirus (CeMV) en calderones (*Globicephala* sp.) del Atlántico.
2. Investigar sobre el origen y la evolución del DMV del brote del Mediterráneo de 2007, mediante la caracterización molecular de dos cepas de DMV detectadas en un delfín listado (*Stenella coeruleoalba*) y un calderón común (*Globicephala melas*) de 2007, y su comparación con la cepa DMV de 1990.
3. Determinar si hubo coinfección de CeMV-HV durante el brote de DMV del Mediterráneo de 2006-2008, así como conocer la caracterización molecular de las secuencias de HV halladas.
4. Detectar e identificar el agente viral causante de una enfermedad sistémica ocurrida en un individuo de una nueva especie hospedadora: el zifio de Cuvier (*Ziphius cavirostris*) varado en el Atlántico.
5. Facilitar la denominación de los diferentes CeMV y HV.

ARTICULOS CIENTIFICOS PUBLICADOS PARA ESTA TESIS



Stenella coeruleoalba. Manuel Arbelo - Universidad de Las Palmas de Gran Canaria

I Análisis filogenético de un nuevo morbillivirus de cetáceo en un calderón tropical varado en las islas Canarias

Bellière EN, Esperón F, Fernández A, Arbelo M, Muñoz MJ, Sánchez-Vizcaíno JM (2011) Phylogenetic analysis of a new Cetacean morbillivirus from a short-finned pilot whale stranded in the Canary Islands. *Research in Veterinary Science*, 90:324-328.

El morbillivirus de cetáceo (CeMV) se considera el virus más patógeno de cetáceos. Tres cepas se han descrito hasta la fecha: el morbillivirus de delfín (DMV), el morbillivirus de marsopa (PMV) y el putativo morbillivirus del calderón (PWMV).

Este estudio describe la caracterización molecular de una cepa de CeMV detectada en el encéfalo de un calderón tropical que varó en el océano Atlántico este cerca de las Islas Canarias y que mostró lesiones compatibles con enfermedad por morbillivirus. Se obtuvieron secuencias de los genes de la nucleoproteína, fosfoproteína, proteína de fusión y proteína de la hemaglutinina. El estudio filogenético demostró una alta similitud (97%) con la cepa PWMV previamente detectada en un calderón común varado en el océano Atlántico oeste. Estos resultados sostienen la clasificación existente de CeMV en tres principales clados genéticos.



Phylogenetic analysis of a new Cetacean morbillivirus from a short-finned pilot whale stranded in the Canary Islands

E.N. Bellière^a, F. Esperón^{a,*}, A. Fernández^b, M. Arbelo^b, M.J. Muñoz^a, J.M. Sánchez-Vizcaíno^c

^a National Institute for Agricultural and Food Research and Technology, Madrid, Spain

^b Institute of Animal Health, University of Las Palmas de Gran Canaria, Spain

^c Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 January 2010

Accepted 28 May 2010

Keywords:

Cetacean morbillivirus
Pilot whale morbillivirus strain
Short-finned pilot whale
Molecular study
Eastern Atlantic Ocean

ABSTRACT

Cetacean morbillivirus (CeMV) is considered the most pathogenic virus in cetaceans. Three strains have been already described: the dolphin morbillivirus (DMV), the porpoise morbillivirus (PMV) and the tentatively named pilot whale morbillivirus (PWMV).

This study describes the molecular characterization of a strain of CeMV detected in the brain of a short-finned pilot whale that had stranded in the Eastern Atlantic Ocean around the Canary Islands and that showed lesions compatible with morbilliviral disease. Sequences for the nucleoprotein, phosphoprotein, fusion protein and haemagglutinin genes were obtained. The phylogenetic study showed high homology (97%) with the PWMV strain previously detected from a long-finned pilot whale stranded in the Western Atlantic Ocean. These results support the existing classification of CeMV into three principal genetic clusters.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Cetacean morbillivirus (CeMV) was recognized about 20 years ago as a significant pathogen of cetaceans worldwide (Barrett et al., 1993; Taubenberger et al., 2000; Van Bresseem et al., 2001; van de Bildt et al., 2005). This virus is classified into the Morbillivirus genus, subfamily Paramyxovirinae, family Paramyxoviridae (ICTV, 2002). Within this genus, six species with different host specificities have been identified: Measles virus (MeV) (humans); Peste-des-petits-ruminants virus (PPRV) and Rinderpest virus (RPV) (ruminants); Phocine distemper virus (PDV) and Canine distemper virus (CDV) (carnivores); and Cetacean morbillivirus (CeMV) (cetaceans).

Several CeMV epizootics in different odontocetes have been recorded, and three different strains have been described: the porpoise morbillivirus (PMV) (Barrett et al., 1993; Kennedy et al., 1988; Visser et al., 1993), the dolphin morbillivirus (DMV) (Barrett et al., 1993; Domingo et al., 1990), and the tentatively named pilot whale morbillivirus (PWMV) (Taubenberger et al., 2000). To our knowledge, only one molecular study of PWMV has been reported to date (Taubenberger et al., 2000).

* Corresponding author. Address: Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA-INIA), Ctra. Algete a El Casar s/n, 28130 Valdeolmos, Madrid, Spain. Tel.: +34 916202300; fax: +34 916202247.

E-mail address: esperon@inia.es (F. Esperón).

The objective of the present study is the molecular characterization of a strain of CeMV detected in a short-finned pilot whale (*Globicephala macrorhynchus*) that presented lesions compatible with morbilliviral disease.

2. Materials and methods

A young male short-finned pilot whale that stranded along the coast of Tenerife, Canary Islands, on 28 July in 1996 was necropsied following standard procedures. Samples from brain and urinary bladder were collected and frozen at −70 °C till processed.

Molecular diagnosis of Cetacean morbillivirus (CeMV) was carried out on the two tissues samples by reverse transcription-PCR (RT-PCR) amplification of a conserved 429-bp region in the morbillivirus phosphoprotein (P) gene (Barrett et al., 1993; Reidarson et al., 1998) (Table 1). Positive control reactions were run in parallel using DMV (MUC strain) (Van Bresseem et al., 1993) grown in Vero cells under standard conditions (Mohanty and Dutta, 1981; Visser et al., 1993). The DMV-MUC virus was kindly provided by Dr. Barrett (Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory, UK). RNA extraction was carried out using the Trizol method (TriPure Reagent, Roche Diagnostics), following the manufacturer's instructions.

After the virus was detected only in the brain tissue using primers DMV-C and DMV-P2 (Barrett et al., 1993), molecular characterization was carried out using nine additional primers. Three were taken from previous studies: NgeneF, NgeneR (Taubenberger

Table 1

List of the primers used and their combination in seven RT-PCRs.

Primer number	Primer name ^a	Target gene ^b	Position in sequence (nt)	Sequence (5'-3')	Sense	Primer combination(s) for RT-PCR	T _m ^c (°C)
1	NgeneF	N	849–874	CCHAGRATYGTCTGAAATGATHTGTGA	+	1–2	48
2	NgeneR	N	1056–1078	AACCTGTTCTGRATWGAGTTC	–		
3	DMV-N1	N	1203–1222	CAAGAGATGGTCAGGAGATC	+	^d 1–11 followed by 3–11	48
4	DMV-C	P	2132–2151	ATGTTTATGATCACAGCGGT	+	4–5	51
5	DMV-P2	P	2541–2560	ATTGGGTTGCACCACTTGTC	–		
6	DMVFu-F	F	6483–6502	GGCACCATAATTAGCCAGGA	+	6–8	55
7	F7	F	6613–6629	GTAGAATTGATCTCGGC	+	7–9	51
						7–11	51
8	DMVFu-R	F	6655–6674	GCCCAGATTGTGCCTACAT	–		
9	H10	H	7193–7209	CCCACGAGTATCAACGG	–		
10	CeMV-He1	H	7194–7213	CRITGATACTYGTGGGTGTG	+	10–11	59
11	CeMV-He2	H	7407–7426	TGTTAACTTCTGGGGCATCC	–		

^a Primers were designed in the present study, except for the following: NgeneF and NgeneR (Taubenberger et al., 2000), DMV-N1 (van de Bildt et al., 2005), DMV-C and DMV-P2 (Barrett et al., 1993).

^b N, nucleoprotein; P, phosphoprotein; F, fusion protein; H, haemagglutinin;

^c T_m, melting temperature.

^d A two-step RT-PCR was carried out to generate the cDNA strand using the He-2 primer.

et al., 2000) and DMV-N1 (van de Bildt et al., 2005). The six remaining ones were designed in the present study and their sequences were based on the complete DMV genome sequence (GenBank Accession No. AJ608288). All the nucleotide positions in the genome are in reference to this sequence (Table 1). The nine primers were combined in five, one-step RT-PCRs (primer combinations 1–2, 6–8, 7–9, 7–11 and 10–11) and in a two-step RT-PCR (primer combination 1–11 followed by primer combination 3–11) (Table 1).

The amplicons obtained were sequenced. A BLAST search was conducted to compare sequenced products with morbillivirus sequences deposited in GenBank. Alignment with the reference DMV sequence (GenBank Accession No. AJ608288) was carried out (Table 2). Phylogenetic analysis was performed using MEGA 4.0 software (Tamura et al., 2007). The *p*-distance matrixes were calculated, and the tree topology was inferred by the neighbor-joining maximum composite likelihood method. The reliability of the topology was tested by bootstrapping 1000 replicates generated with a random seed.

The input data for the construction of the phylogenetic trees included all CeMV sequences available, as well as the sequences corresponding to the other five species of morbillivirus (PPRV, RPV, MeV, PDV, CDV) with Sendai virus (SeV) as outgroup.

Table 2

Sequences obtained from the CeMV detected in the present study.

Genome position of the protein coding region ^a	Primer combination for RT-PCR ^b	Genome position (nt) of the amplified product ^a	Length of the amplified product (bp)	Genome position of the consensus sequences obtained
N 108–1679	1–2	898–1055	158	N1 898–1055
	1–11	1270–1414	145	N2 1270–1414
	followed by 3–11			
P 1801–3321	4–5	2183–2540	358	P 2183–2540
F 5277–6935	6–8	6503–6654	152	
	7–10	6630–7159	530	F/H 6503–7406
			904	
H 7091–8905	7–11	6858–7370	513	
	10–11	7214–7406	193	

^a All genomic positions refer to the DMV sequence (GenBank Accession No. AJ608288).

^b Primer combinations refer to the primers described in Table 1.

3. Results

At necropsy the stomach was found empty. The main gross pathological finding was purulent pneumonia. Severe, diffuse, non-purulent encephalomyelitis was diagnosed by histopathology in different areas of the brain and cranial spinal cord. Apart from this single stranding, no other mortality event involving short-finned pilot whales was recorded in 1996.

Seven RT-PCR products were obtained from the brain sample and analyzed, yielding four sequences that corresponded to a total of 1565 bp (Table 2): (1) two fragments of the nucleoprotein gene at positions N1 (nt 898–1055, 158 bp; GenBank Accession No. FJ842380) and N2 (nt 1270–1414, 145 bp; GenBank Accession No. GQ149614); (2) one fragment of the phosphoprotein gene P2 (nt 183–2540, 358 bp; GenBank Accession No. FJ842381); and (3) one fragment involving both the fusion protein and haemagglutinin genes F/H (nt 6503–7406, 904 bp; GenBank Accession No. FJ842382).

Five phylogenetic trees were constructed based for fragments N1 (155 bp), N2 (140 bp), P (296 bp), F (538 bp) and H (312 bp) (Figs. 1 and 2).

The overall *p*-distance of the fragments obtained ranged from 0.14 to 0.15 for the CeMV strains (DMV and PMV), and from 0.40 to 0.46 for the other morbilliviruses (PPRV, RPV, MV, PDV, CDV). It is important to note that PWMV sequences were available only for the fragments N1 (GenBank Accession No. FJ842380) and P (GenBank Accession No. FJ842381) (Taubenberger et al., 2000). The *p*-distances demonstrated that the sequences detected in this study were phylogenetically closest to the PWMV strain, being 0.03 the overall *p*-distance among them.

Construction of the phylogenetic trees is showing three different clusters within CeMV. One of them corresponds to the PMV sequences, another one to the DMV and strongly related sequences, and a third cluster is formed by the sequences from the PWMV strain and by those described in this study (Figs. 1 and 2).

4. Discussion and conclusions

The presence of non-purulent encephalitis was consistent with morbilliviral disease (Domingo et al., 1990; Kennedy et al., 1988). Morbilliviral infections in cetaceans were initially described in dolphins and porpoises from European waters (Domingo et al., 1990; Kennedy et al., 1988). Subsequent publications demonstrated that

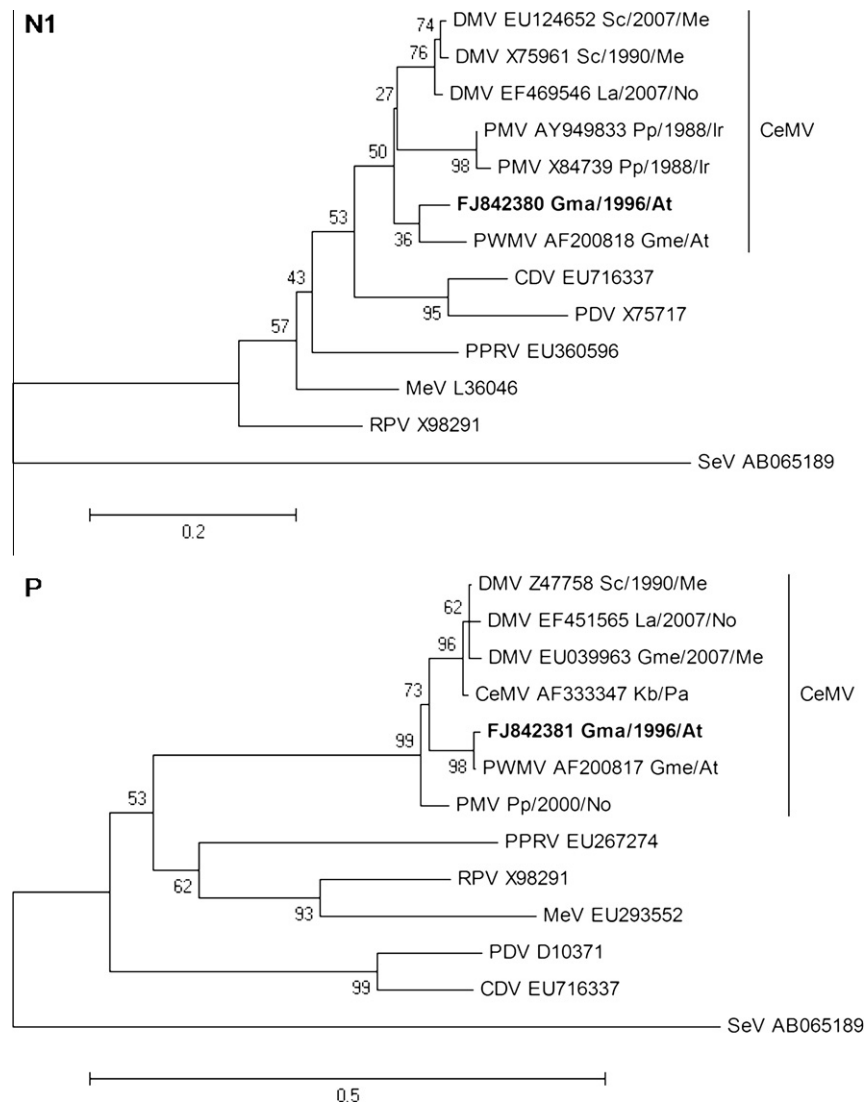


Fig. 1. Neighbor-joining phylograms of nucleoprotein (N1) and phosphoprotein (P) sequences from morbilliviruses. The scale bar indicates phylogenetic distance. The name of each sequence gives the following information: virus name, GenBank accession number, the Cetacean species infected, the year of stranding and the geographical area of the stranding. DMV, dolphin morbillivirus; CeMV, Cetacean morbillivirus; PMV, porpoise morbillivirus; PWMV, pilot whale morbillivirus; PPRV, Peste-des-petits-ruminants virus; RPV, Rinderpest virus; CDV, Canine distemper virus; PDV, Phocine distemper virus; MeV, Measles virus; SeV, Sendai virus; At, Atlantic Ocean; Me, Mediterranean Sea; No, North Sea; Pa, Pacific Ocean; Ir, Northern Ireland; Sc, *Stenella coeruleoalba*; Gme, *Globicephala melas*; La, *Lagenorhynchus albirostris*; Kb, *Kogia breviceps*; Tt, *Tursiops truncatus*; Pp, *Phocoena phocoena*; Gma, *Globicephala macrorhynchus*.

these viruses though closely related differ antigenically and genetically, and should be considered strains of CeMV (Barrett et al., 1993; Blixenkrone-Møller et al., 1996; Bolt et al., 1994; Visser et al., 1993).

A later report, in the Atlantic coast of USA, a long-finned pilot whale (*Globicephala melas*) was stranded with lesions compatible with morbilliviral infection. A novel sequence belonging to CeMV was detected by RT-PCR, tentatively named pilot whale morbillivirus (PWMV) (Taubenberger et al., 2000).

At this point, we report the morbilliviral infection of a short-finned pilot whale (*G. macrorhynchus*) stranded in the Canary Islands (Eastern Atlantic Ocean). The sequences N1 and P (Fig. 1) were closer related to the PWMV than to the DMV and PMV strains. In the case of the other three trees (Fig. 2), where none sequences of PWMV were available in the GenBank to compare with, the sequences obtained from this study fitted successfully as a new group inside the CeMV. In conclusion, despite the scarce data of CeMV sequences affecting cetaceans, the results support the exist-

ing division of CeMV strains into three groups (Van Bressem et al., 2009).

The presence of PWMV in *G. melas* and PWMV-like in *G. macrorhynchus* from the Atlantic Ocean could give new information for a reported aspect of the CeMV epidemiology that is the potential role played by both *Globicephala* sp. in the spread of the different CeMV strains. An epidemiological study previous to the first detection of PWMV showed high seroprevalences against CeMV (86%) in both *Globicephala* sp. in the north Atlantic (USA), without the occurrence of die-offs (Duignan et al., 1995). Duignan and co-workers proposed that pilot whales could maintain PMV and DMV strains, transmitting them to distant geographic regions or to other odontocetes (Duignan et al., 1995; Van Bressem et al., 2009).

Despite the high seroprevalences found in pilot whales from the Atlantic, the only two molecular studies of Atlantic pilot whales to our knowledge, have detected only PWMV (Taubenberger et al., 2000) or a PWMV-like strain (this study), not DMV or PMV. Given the fact that there are serological cross reactions between different

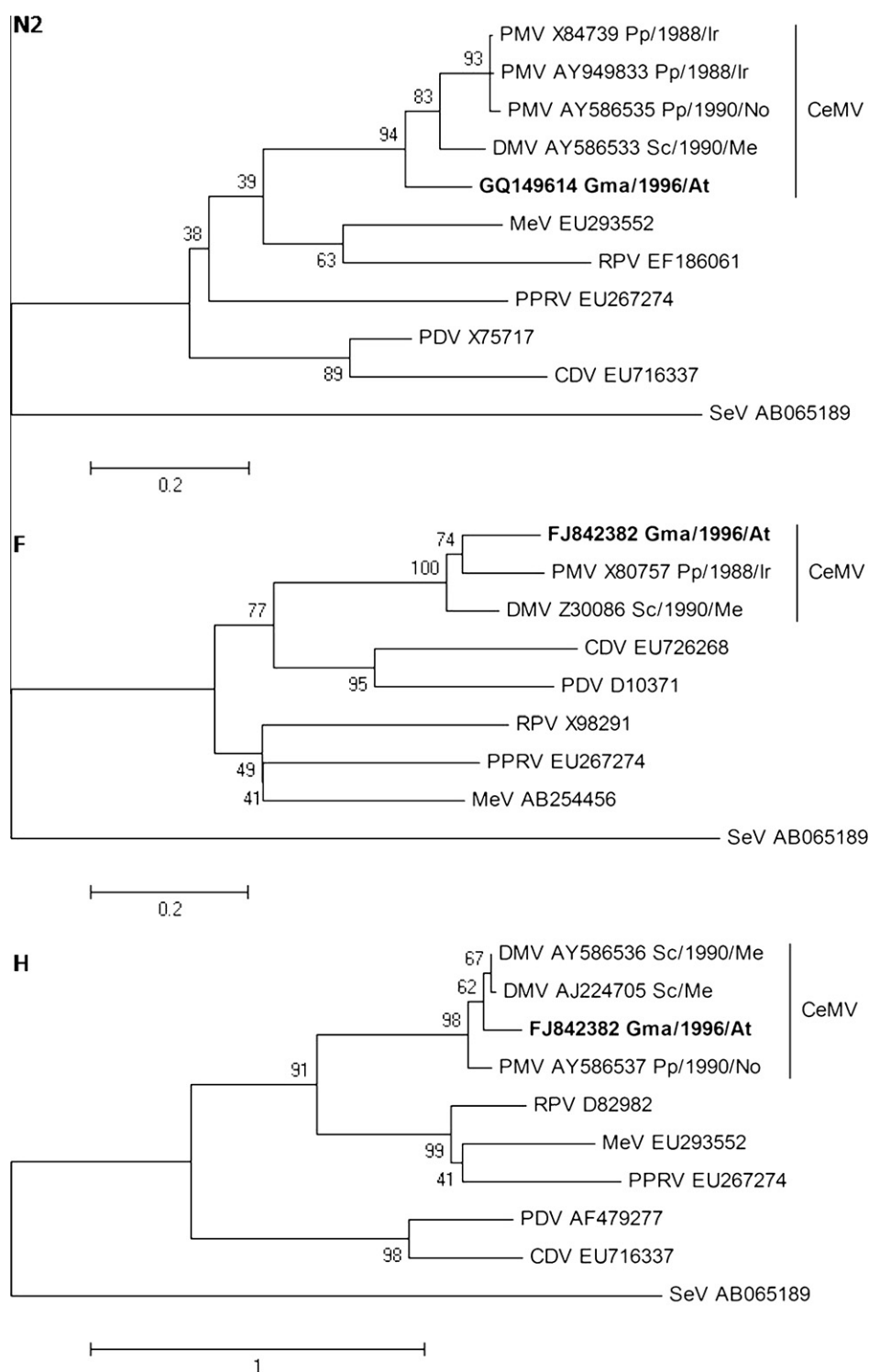


Fig. 2. Neighbor-joining phylograms of nucleoprotein (N2), fusion protein (F) and haemagglutinin (H) sequences from morbilliviruses. The scale bar indicates phylogenetic distance. The name of each sequence gives the following information: virus name, GenBank accession number, the Cetacean species infected, the year of stranding and the geographical area of the stranding. DMV, dolphin morbillivirus; CeMV, Cetacean morbillivirus; PMV, porpoise morbillivirus; PWMV, pilot whale morbillivirus; PPRV, Pestes-des-petits-ruminants virus; RPV, Rinderpest virus; CDV, Canine distemper virus; PDV, Phocine distemper virus; MeV, Measles virus; SeV, Sendai virus; At, Atlantic Ocean; Me, Mediterranean Sea; No, North Sea; Ir, Northern Ireland; Sc, *Stenella coeruleoalba*; Pp, *Phocoena phocoena*; Gma, *Globicephala macrorhynchus*.

species of morbillivirus (Duignan et al., 1995; Van Bressem et al., 2001), our work suggests the need to look more closely at which CeMV strains are infecting pilot whales, including in those cetaceans with asymptomatic infections.

DMV was responsible for at least 60 strandings of long-finned pilot whales on the Spanish Mediterranean coast in

2006 (De Stephanis et al., 2009; Fernandez et al., 2008), supporting that this species is susceptible to the DMV strain. The outbreak affected all age classes (Fernandez et al., 2008). This suggests that Mediterranean pilot whales did not have immunity against the virus and that it did not circulate endemically in this population.

This work provides the first molecular study and data on the pathology of CeMV infection in a short-finned pilot whale in the Eastern Atlantic Ocean. The strain detected from this pilot whale shows 97% homology with the PWMV strain previously reported in a long-finned pilot whale from the Western Atlantic. These two strains of virus could be widely distributed among the Atlantic pilot whales, and this possibility should be explored in future molecular studies.

Conflict of interest statement

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Acknowledgments

We are grateful to Elena Neves and Verónica Nogal for their technical assistance. This work was partially funded by Project CGL2009-08125 of the Spanish Government's National Research Plan, and by the Agreement INIA-MARM CC08-020.

References

- Barrett, T., Visser, I.K., Mamaev, L., Goatley, L., van Bressem, M.F., Osterhaus, A.D., 1993. Dolphin and porpoise morbilliviruses are genetically distinct from phocine distemper virus. *Virology* 193, 1010–1012.
- Blixenkrone-Møller, M., Bolt, G., Jensen, T.D., Harder, T., Svansson, V., 1996. Comparative analysis of the attachment protein gene (H) of dolphin morbillivirus. *Virus Research* 40, 47–55.
- Bolt, G., Blixenkrone-Møller, M., Gottschalk, E., Wishaupt, R.G., Welsh, M.J., Earle, J.A., Rima, B.K., 1994. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the matrix (M) and fusion (F) protein genes of Cetacean morbilliviruses isolated from a porpoise and a dolphin. *Virus Research* 34, 291–304.
- De Stephanis, R., Verborgh, P., Gauffier, P., 2009. Las poblaciones de calderón común *Globicephala melas* en el Estrecho de Gibraltar. *MIGRES Revista de Ecología* 1, 37–45.
- Domingo, M., Ferrer, L., Pumarola, M., Marco, A., Plana, J., Kennedy, S., McAliskey, M., Rima, B.K., 1990. Morbillivirus in dolphins. *Nature* 348, 21.
- Duignan, P.J., House, C., Geraci, J.R., Early, G., Copland, H.G., Walsh, M.T., Bossart, G.D., Cray, C., Sadove, S., St. Aubin, D.J., Moore, M., 1995. Morbillivirus infection in two species of pilot whales (*Globicephala* sp.) from the western Atlantic. *Marine Mammal Science* 11, 150–162.
- Fernandez, A., Esperon, F., Herraiz, P., de Los Monteros, A.E., Clavel, C., Bernabe, A., Sanchez-Vizcaino, J.M., Verborgh, P., DeStephanis, R., Toledano, F., Bayon, A., 2008. Morbillivirus and pilot whale deaths, Mediterranean Sea. *Emerging Infectious Diseases* 14, 792–794.
- ICTV, 2002 ICTVdb index of viruses (on line). International Committee on Taxonomy of Viruses, UK. Available from: <<http://www.ictvdb.rothamsted.ac.uk/ictv/index.htm>>.
- Kennedy, S., Smyth, J.A., Cush, P.F., McCullough, S.J., Allan, G.M., McQuaid, S., 1988. Viral distemper now found in porpoises. *Nature* 336, 21.
- Mohanty, S.B., Dutta, S.K., 1981. Laboratory diagnosis of viral disease. *Veterinary Virology*, Philadelphia: Lea and Febiger, Baillière Tindal, London, pp. 87–96.
- Reidarson, T.H., McBain, J., House, C., King, D.P., Stott, J.L., Krafft, A., Taubenberger, J.K., Heyning, J., Lipscomb, T.P., 1998. Morbillivirus infection in stranded common dolphins from the Pacific Ocean. *Journal of Wildlife Diseases* 34, 771–776.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24, 1596–1599.
- Taubenberger, J.K., Tsai, M.M., Atkin, T.J., Fanning, T.G., Krafft, A.E., Moeller, R.B., Kodosi, S.E., Mense, M.G., Lipscomb, T.P., 2000. Molecular genetic evidence of a novel morbillivirus in a long-finned pilot whale (*Globicephalus melas*). *Emerging Infectious Diseases* 6, 42–45.
- Van Bressem, M.F., Visser, I.K., De Swart, R.L., Orvell, C., Stanzani, L., Androukaki, E., Siakavara, K., Osterhaus, A.D.M.E., 1993. Dolphin morbillivirus infection in different parts of the Mediterranean Sea. *Archives of Virology* 129, 235–242.
- Van Bressem, M., Waerebeek, K.V., Jepson, P.D., Raga, J.A., Duignan, P.J., Nielsen, O., Di Benedetto, A.P., Siciliano, S., Ramos, R., Kant, W., Peddemors, V., Kinoshita, R., Ross, P.S., Lopez-Fernandez, A., Evans, K., Crespo, E., Barrett, T., 2001. An insight into the epidemiology of dolphin morbillivirus worldwide. *Veterinary Microbiology* 81, 287–304.
- Van Bressem, M.F., Raga, J.A., Di Guardo, G., Jepson, P.D., Duignan, P.J., Siebert, U., Barrett, T., de Oliveira Santos, M.C., Moreno, I.B., Siciliano, S., 2009. Emerging infectious diseases in cetaceans worldwide and the possible role of environmental stressors. *Disease of Aquatic Organisms* 86, 143–157.
- van de Bildt, M.W., Kuiken, T., Osterhaus, A.D., 2005. Cetacean morbilliviruses are phylogenetically divergent. *Archives of Virology* 150, 577–583.
- Visser, I.K., Van Bressem, M.F., de Swart, R.L., van de Bildt, M.W., Vos, H.W., van der Heijden, R.W., Saliki, J.T., Orvell, C., Kitching, P., Kuiken, T., et al., 1993. Characterization of morbilliviruses isolated from dolphins and porpoises in Europe. *Journal of General Virology* 74 (Pt 4), 631–641.

II Comparación genética entre morbillivirus de delfín de los brotes del mediterráneo de 1990-1992 y 2006-2008

Bellière EN, Esperón F, Sánchez-Vizcaíno JM (2011) Genetic comparison among dolphin morbillivirus in the 1990-1992 and 2006-2008 Mediterranean outbreaks. *Infection, Genetics and Evolution* 11:1913-1920

En 1990, el morbillivirus de delfín (DMV) mató a miles de *S. coeruleoalba* en el Mediterráneo. Posteriormente, la prevalencia de la infección disminuyó en estas especies. En 2006-2008, el virus mató no solamente numerosos *S. coeruleoalba*, sino que también *G. melas*. Todas las secuencias parciales de los genes de la fosfoproteína y de la nucleoproteína obtenidas hasta el momento desde diferentes especies hospedadoras durante el brote de 2006-2008 muestran una identidad del 100%, lo que sugiere que un único virus estaba implicado, y estas secuencias son casi idénticas a la cepa española de 1990. Aquí nuestro primer objetivo fue determinar la identidad de secuencias entre el morbillivirus del brote de 2006-2008 y la cepa española de 1990 mediante la secuenciación de regiones genómicas más largas de las cepas de un *G. melas* y un *S. coeruleoalba* varados en 2007. El segundo objetivo fue investigar la relación entre las cepas de 1990 y 2007 mediante la construcción de un árbol filogenético basado en el gen de la fosfoproteína para comparar varios morbillivirus de cetáceos, y otro árbol basado en los casi completos genomas de los DMV del Mediterráneo. El tercer objetivo fue identificar las regiones más variables en los genomas de DMV.

Los resultados demostraron que las dos cepas españolas de 2007 eran 99,9% idénticas sobre 9050 pb y que debían considerarse el mismo virus, y que este virus es 99,3-99,4 % similar a la cepa española de 1990. Los árboles filogenéticos, junto con el área geográfica común para los dos brotes, sugiere que las cepas de DMV de 2007 evolucionaron de la cepa DMV 1990. Los *G. melas* no parecen haber sido expuestos o infectados durante la epidemia de 1990-1992, ya que estas poblaciones parecían ser *naïve* inmunológicamente en 2006-2008.

Nuestros resultados sugieren que el virus ha podido evolucionar en las poblaciones de *S. coeruleoalba* antes del brote de 2006-2008, tras lo cual entró en el *G. melas*, quizás ayudado por una mutación de alanina a valina en el dominio N-terminal de la proteína de fusión.



Genetic comparison among dolphin morbillivirus in the 1990–1992 and 2006–2008 Mediterranean outbreaks

Edwige Nina Bellière^{a,*}, Fernando Esperón^a, José Manuel Sánchez-Vizcaíno^b

^a National Institute for Agricultural and Food Research and Technology (INIA), Research Center for Animal Health (CISA), Ctra Algete a El Casar, s/n, 28130 Valdeolmos, Spain

^b Complutense University of Madrid (UCM), Faculty of Veterinary, Avda Puerta de Hierro, s/n, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 February 2011

Received in revised form 9 August 2011

Accepted 16 August 2011

Available online 26 August 2011

Keywords:

Genetic comparison

Cetacean morbillivirus

Dolphin morbillivirus

Mediterranean Sea

Striped dolphins

Long-finned pilot whales

ABSTRACT

In 1990, dolphin morbillivirus (DMV) killed thousands of striped dolphins in the Mediterranean. Subsequently, the prevalence of the infection declined in this species. In 2006–2008, the virus killed not only numerous striped dolphins but also long-finned pilot whales. All partial sequences of the phosphoprotein and nucleoprotein genes obtained thus far from different host species during the 2006–2008 outbreak show 100% identity, suggesting that a single virus was involved, and these sequences are nearly identical to the 1990 Spanish strain. Here our first objective was to determine the sequence identity between the morbillivirus from the 2006–2008 outbreak and the 1990 Spanish strain by sequencing more extensive genomic regions of strains from one pilot whale and one striped dolphin stranded in 2007. The second objective was to investigate the relationship between the 1990 and 2007 strains by constructing a phylogenetic tree based on the phosphoprotein gene to compare several Cetacean morbilliviruses, and another tree based on the nearly complete genomes of Mediterranean DMV. The third objective was to identify the most variable regions in the DMV genomes.

Results showed that the two 2007 Spanish strains were 99.9% identical over 9050 bp and should be considered the same virus, and that this virus is 99.3–99.4% similar to the 1990 Spanish strain. The phylogenetic trees, together with the common geographical area for the two outbreaks, suggest that the 2007 DMV strains evolved from the 1990 DMV strain. Pilot whales do not seem to have been exposed or infected during the 1990–1992 epidemic, since these populations appeared to be immunologically naïve in 2006–2008. Our results suggest that the virus may have evolved in striped dolphin populations prior to the 2006–2008 outbreak, after which it entered the long-finned pilot whale, perhaps aided by an alanine to valine mutation in the N-terminal domain of the fusion protein.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Until 1988, the *Morbillivirus* genus, of the family *Paramyxoviridae* and subfamily *Paramyxovirinae* (ICTV, 2002), was thought to comprise four members with specific hosts: *Measles virus* (MeV), *Canine distemper virus* (CDV), *Rinderpest virus* (RPV) and *Peste-des-petits-ruminants virus* (PPRV) (Blixenkrone-Møller et al., 1994). Since 1988, morbillivirus infection (MI) has been described in marine mammals: pinnipeds (Blixenkrone-Møller et al., 1994; Cosby et al., 1988; Mahy et al., 1988) and cetaceans (Domingo et al., 1990; Kennedy et al., 1988). Since 1994, the genus has included the new species “*Cetacean morbillivirus*” (CeMV) (Bolt et al., 1994; ICTV, 2002), which includes three main groups of strains (Van Bressemer et al., 2009): “porpoise morbillivirus” (PMV) (Barrett et al., 1993; Kennedy et al., 1988; Osterhaus et al.,

1992), “dolphin morbillivirus” (DMV) (Barrett et al., 1993; Domingo et al., 1990; Osterhaus et al., 1992) and “pilot whale morbillivirus” (PWMV) (Bellière et al., 2011; Taubenberger et al., 2000).

Together with the Phocine distemper virus (PDV) (Kennedy, 1998), CeMV has recently emerged as a cause of epidemics worldwide (Van Bressemer et al., 2009). The highest mortality was recorded for striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) in the 1990–1992 DMV outbreak in the Mediterranean Sea, in which several thousands of animals died (Aguilar and Raga, 1993). Subsequently, the prevalence of MI declined in striped dolphins (Van Bressemer et al., 2001). The DMV genome from this epidemic is the only CeMV genome that has been completely sequenced (Rima et al., 2005). It is a 15,702-bp, negative single-stranded, non-segmented RNA molecule containing six genes; these genes encode eight proteins, six of which are structural, and they are organized in the following order: 3′ – nucleoprotein (N) – phosphoprotein (P) – matrix protein (M) – fusion protein (F) – hemagglutinin protein (H) – large protein (L) – 5′ (Rima et al., 2005).

* Corresponding author. Tel.: +34 91 620 23 00; fax: +34 91 620 22 47.

E-mail addresses: nina.belliere@inia.es (E.N. Bellière), esperon@inia.es (F. Esperón), jmvizcaino@visavet.ucm.es (J.M. Sánchez-Vizcaíno).

As early as 1994, morbillivirus infection (MI) has also been shown in other cetacean species from the Mediterranean: *Tursiops truncatus*, *Grampus griseus*, *Steno bredanensis*, *Balaenoptera physalus*, *Balaenoptera acutorostrata* and *Delphinus delphis ponticus* (Barrett et al., 1995; Birkun et al., 1999; Kennedy, 1998; Tsur et al., 1997). However, no data are available about MI in pilot whales from the Mediterranean before 2006.

The DMV outbreak in 2006–2008 affected three different cetacean species along the Spanish and French Mediterranean coast: the striped dolphin *S. coeruleoalba*, the bottlenose dolphin *T. truncatus* and the long-finned pilot whale *Globicephala melas* (De Stephanis et al., 2009; Fernández et al., 2008; Keck et al., 2010; Raga et al., 2008). The epizootic began by affecting long-finned pilot whales in the Strait of Gibraltar from October 2006 to April 2007 (Fernández et al., 2008). Then, another outbreak occurred in the Spanish Mediterranean between July and October 2007, involving the mass stranding of more than 100 striped dolphins (Raga et al., 2008). Along the Mediterranean French coast, mass strandings were recorded between August 2007 and March 2008 affecting more than 100 striped dolphins, one long-finned pilot whale and five bottlenose dolphins (Keck et al., 2010).

Several sets of primers have been used to target a total of 577 bp of the DMV genomes circulating in the 2006–2008 outbreak: 389 bp of the P gene (Fernández et al., 2008; Keck et al., 2010) and 188 bp of the N gene (Raga et al., 2008). Using a set of “universal” morbillivirus reverse transcription-PCR (RT-PCR) primers targeting the P gene (Barrett et al., 1993), a large number of tissue samples was analyzed from 17 individuals of three different species: nine *S. coeruleoalba*, seven *G. melas*, and one *T. truncatus* (Fernández et al., 2008; Keck et al., 2010). Moreover, RT-PCR was used to obtain a partial N gene sequence from one striped dolphin (Raga et al., 2008). All the P gene sequences were 100% identical, and based on both N and P gene sequences, the 2007 Spanish strain was shown to be nearly identical to the 1990 Spanish strain (Fernández et al., 2008; Keck et al., 2010; Raga et al., 2008).

The present work sought to perform more extensive sequencing to verify whether the strains affecting dolphins and pilot whales in the 2006–2008 outbreak are the same, and whether the high level of sequence identity observed between the 1990 and 2007 DMV strains holds true for the rest of the genome. Therefore, we sequenced five of the six structural protein genes of the morbillivirus genomes obtained from one pilot whale and one striped dolphin stranded in 2007, the two cetacean species most affected by the 2006–2008 outbreak. To select the appropriate samples, the 1990 DMV strain was compared with F gene sequences previously obtained from 6 *G. melas* animals and 8 *S. coeruleoalba* animals (Bellière et al., 2010). The *G. melas* animals were the same as those for which partial P gene sequences had been obtained by RT-PCR (Fernández et al., 2008). All the sequences were 100% identical, except that from striped dolphin ID 320, where a synonymous substitution at position 6587 (G→A) resulted in a p-distance of 0.007 (data not shown). Therefore the potentially more divergent strain from dolphin ID 320 was selected for more extensive sequencing in order to obtain a better approximation of the strains circulating in the 2006–2008 outbreak.

The consensus genome obtained from the striped dolphin was then compared with known P gene sequences (Fernández et al., 2008; Keck et al., 2010), and the consensus genomes obtained from the striped dolphin and the long-finned pilot whale were compared with the N gene sequence previously determined (Raga et al., 2008).

Finally, the two nearly complete consensus DMV genomes from 2007 were compared with the 1990 DMV strain to determine their degree of similarity.

The second objective of the present study was to investigate the evolutionary relationship between 1990 and 2007 DMV strains by constructing two phylogenetic trees, one based on the P gene and the other based on the three DMV genomes obtained so far. The third objective was to identify the location of substitutions among the three extensive DMV sequences in order to detect the most informative regions within the genome. To our knowledge, this is the first published comparison of such extensive DMV sequences from different outbreaks and different host species.

2. Materials and methods

2.1. Virus strains

This study used two DMV strains identified by RT-PCR from two brain samples stored at -70°C (Bellière et al., 2010): one from *G. melas* ID 181 stranded on 28 February 2007 (DMV_Gme/2007), and the other from *S. coeruleoalba* ID 320 stranded on 9 August 2007 (DMV_Sc/2007).

2.2. Primer design

To characterize the DMV strains detected from these two species of cetaceans, new primers were designed for the complete sequencing of five of the six structural protein genes of the morbillivirus genome: N, P, M, F and H. The complete CeMV genome (Genbank Accession AJ608288) was aligned with the four other complete morbilliviral genomes using Mega 4.0 software (Tamura et al., 2007): CDV (Genbank AF014953), MeV (K01711), RPV (X98291) and PPRV (X74443). Eleven new primers were designed manually within the regions most conserved among the five morbillivirus species. In addition, six previously described primers were used (Barrett et al., 1993; Taubenberger et al., 2000; van de Bilt et al., 2005). Thus, a total of 17 primers were used (Table 1).

2.3. RT-PCR

The two brain samples were macerated in $1\times$ PBS diluted 1:10 and RNA was extracted using the Trizol method (TriPure Reagent, Roche Diagnostics), following the manufacturer's instructions. The primer DMV2 was used to synthesize cDNA from total RNA using the RT Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche), with incubation at 50°C for 60 min, followed by incubation at 85°C for 5 min. A cDNA library was constructed using 16 primers in different combinations in eight PCR reactions (primer combinations 1–3, 2–5, 4–7, 6–9, 8–11, 10–13, 12–15, 14–16; Table 1) and a high-fidelity polymerase (Expand High Fidelity PLUS Enzyme Blend, Roche). Since the expected size of all the PCR products was approximately 1000 bp, the PCR program was the same for all the reactions: 2 min at 94°C ; 35 cycles of 30 s at 94°C , 30 s at 55°C , 1 min at 72°C ; 7 min at 72°C . PCR reactions were run out on 2% agarose gels and stained with SYBR Green (Qiagen) to visualize amplification products.

2.4. Cloning and sequencing

DNA fragments were purified (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega), cloned into the plasmid vector pGEM-T (Promega) and grown in JM 109 *Escherichia coli* (Promega) following the manufacturer's instructions. Every PCR product was cloned, three clones of each fragment were chosen, and plasmid DNA was purified (Wizard® Plus SV Minipreps, Promega). Sequencing was carried out using the primers T7 (forward) and SP6 (reverse). The Cycle Sequencing Kit (Big Dye Terminator, version 3.1, Applied Biosystems) was used in conjunction with a 3730 DNA Analyzer

Table 1

List of the primers used. Eleven primers were designed in the present study, and six were taken from previous work: NgeneF and NgeneR (Taubenberger et al., 2000), DMV-N1 and DMV-N2 (van de Bildt et al., 2005), DMV-C and DMV-P2 (Barrett et al., 1993). The DMV2 primer was used for cDNA production. Nucleotide positions are reported with respect to the DMV sequence (GenBank Acc. No. AJ608288).

Primer no.	Primer name	nt Position (referenced to DMV)	5'–3' sequence (sense)	Primer combination for PCR
1	DMV1	1–21	ACCARACAAAGYTGSTARGG (+)	1–3
2	NgeneF	849–874	CCHAGRATYCTGAAATGATHTGTGA (+)	2–5
3	NgeneR	1056–1078	AACCTGTTCTGRATWGAGTTYTC (–)	
4	DMV-N1	1203–1222	CAAGAGATGGTCAGGAGATC (+)	4–7
5	DMV-N2	1695–1711	AACCTGTTCTGRATWGAGTTYTC (–)	
6	DMV-C	2132–2151	ATGTTTATGATCACAGCGGT (+)	6–9
7	DMV-P2	2541–2560	ATTGGGTTGCACCACTTGTG (–)	
8	P1	3268–3284	AGTGGCAAGGATCTTGG (+)	8–11
9	M2	3549–3565	CTGTACCTAAGCCTGG (–)	
10	M3	4743–4759	CACAGATCCTCTCTCG (+)	10–13
11	F4	4982–4998	CTGGTGTGGTCGATTGC (–)	
12	F5	5280–5296	GCCGCTAGTAACGGCGG (+)	12–15
13	F6	5852–5868	CGCAAGACAGCTGGTGC (–)	
14	F9	6965–6981	AACACCAAAACCTAGGC (+)	14–16
15	H10	7193–7209	CCCACGAGTATCAACGG (–)	
16	DMV5	9072–9094	CTATCHAGRTGVACYTCMGGGTA (–)	
17	DMV2	15684–15702	ATHCCAGCTTTGTCTGGT (–)	cDNA production

(Applied Biosystems). Triplicate sequences obtained for each fragment were aligned with the reference DMV genome (AJ608288) using SeqScape® software (version 2.5, Applied Biosystems). To obtain consensus sequences, exported chromatograms were manually reviewed and nucleotides corresponding to primer binding positions were removed.

2.5. Phylogenetic analysis

First, the Clustal W option in MEGA 4.0 was used to align the two nucleotide sequences obtained from DMV_Gme/2007 and DMV_Sc/2007 with the reference DMV sequence (DMV_Sc/1990, GenBank Acc. No. AJ608288).

MEGA 4.0 was used to calculate the p-distances on the N gene among the sequence obtained from one dolphin (GenBank Acc. No. EU124652) (Raga et al., 2008), DMV_Gme/2007, DMV_Sc/2007 and DMV_Sc/1990. It was also used to calculate the p-distances on the P gene among the sequences obtained from 17 individuals (GenBank Acc. No. EU039963) (Fernández et al., 2008; Keck et al., 2010), DMV_Gme/2007, DMV_Sc/2007 and DMV_Sc/1990.

The same software was then used to deduce the corresponding amino acid sequences, calculate a p-distance matrix based

on nucleotide and amino acid differences among the three sequences (DMV_Gme/2007, DMV_Sc/2007 and DMV_Sc/1990), and construct two unrooted neighbor-joining trees. In the first tree, based on the P gene, these three sequences were compared with the other CeMV sequences available in GenBank (GenBank Acc. Nos. EF451565, AF333347, FJ842381, AF200817), the PMV described in 1993 (Barrett et al., 1993) and the other five species of morbillivirus (PPRV, RPV, MeV, CDV and PDV). In the second tree, DMV_Gme/2007, DMV_Sc/2007 and DMV_Sc/1990 were compared over their entire consensus length, with PPRV added as an outgroup member.

3. Results

All the RT-PCR reactions gave the expected amplicons (~1000 bp), and all amplicons were successfully cloned. The total consensus length for DMV_Gme/2007 (GenBank Acc. No. HQ829972) and DMV_Sc/2007 (GenBank Acc. No. HQ829973) was 9050 bp, extending from nucleotide 22 to 9071 based on the DMV_Sc/1990 sequence (Genbank Acc. No. AJ608288). The p-distance calculated within the DMV N gene sequences (GenBank

Table 2

Matrix of p-distances based on sequence comparisons of DMV_Sc/1990, DMV_Gme/2007 and DMV_Sc/2007 at the nucleotide level (upper panel) and amino acid level (lower panel). The p-distance matrix is based on the 9050-bp consensus sequence obtained and refers to each coding sequence (CDS), to the overall CDS and to untranslated regions (UTRs). The number of nucleotide or amino acid differences is indicated in parentheses next to the p-distance value. N, nucleoprotein; P, phosphoprotein; M, matrix protein; F, fusion protein; H, hemagglutinin protein.

Nucleotide sequences compared	Protein coding sequence (nt length)					Overall CDS (7575)	Overall UTR (1475)	Total length (9050)
	N (1572)	P (1521)	M (1008)	F (1659)	H (1815)			
DMV_Sc/1990	0.009	0.005	0.001	0.006	0.005	0.005	0.012	0.006
DMV_Gme/2007	(14)	(7)	(1)	(10)	(9)	(41)	(17)	(58)
DMV_Sc/1990	0.010	0.005	0.002	0.007	0.005	0.006	0.011	0.007
DMV_Sc/2007	(15)	(7)	(2)	(11)	(9)	(44)	(16)	(60)
DMV_Gme/2007	0.001	0.000	0.001	0.002	0.000	0.001	0.002	0.001
DMV_Sc/2007	(1)	(0)	(1)	(3)	(0)	(5)	(3)	(8)
Amino acid sequences compared	Protein (aa length)					Overall (2520 aa)		
	N (523)	P (506)	M (335)	F (552)	H (604)			
DMV_Sc/1990	0.006	0.006	0.003	0.005	0.002	0.004		
DMV_Gme/2007	(3)	(3)	(1)	(3)	(1)	(11)		
DMV_Sc/1990	0.008	0.006	0.003	0.005	0.002	0.005		
DMV_Sc/2007	(4)	(3)	(1)	(3)	(1)	(12)		
DMV_Gme/2007	0.002	0.000	0.000	0.004	0.000	0.001		
DMV_Sc/2007	(1)	(0)	(0)	(2)	(0)	(3)		

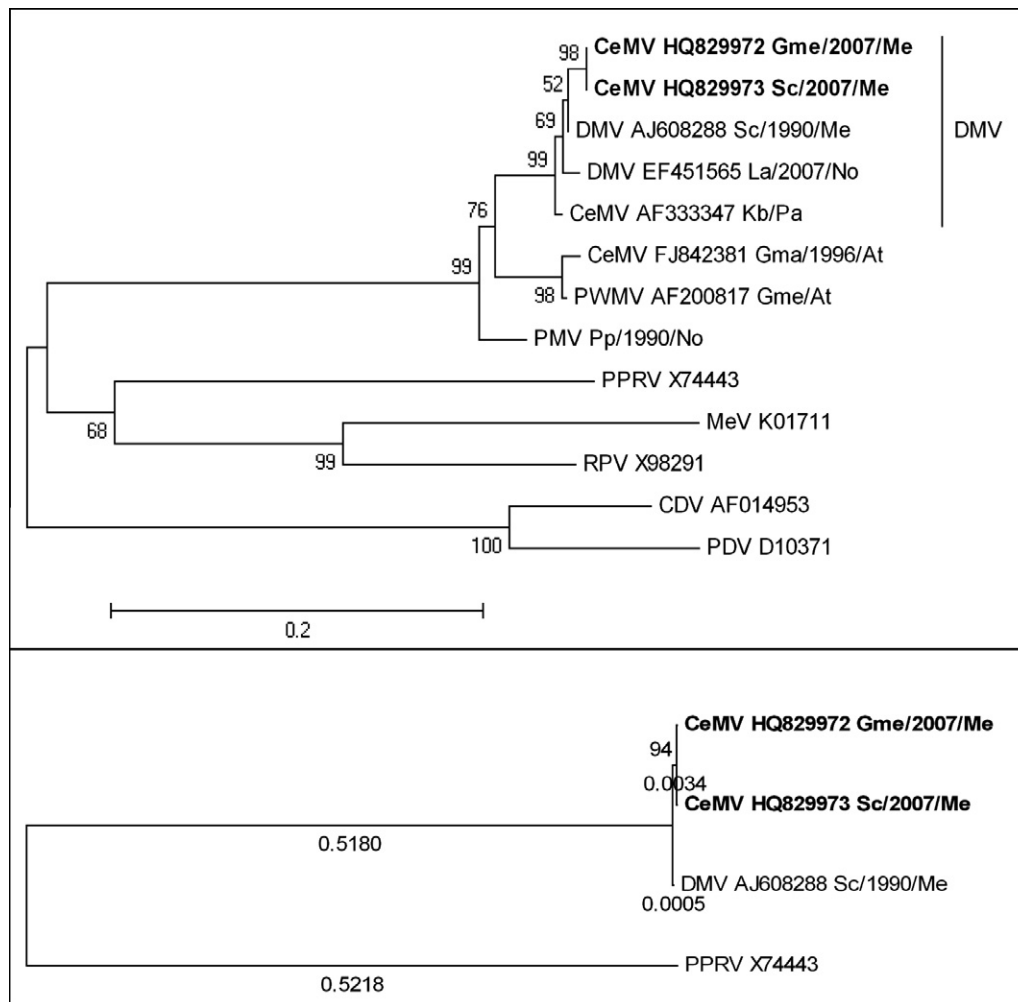


Fig. 1. Two unrooted neighbor-joining phylogenetic trees based on the maximum composite likelihood substitution model were constructed. Bootstrapping values were performed with 1000 replicates and are indicated as percentages next to bifurcations. Branch length reflects the number of nucleotide substitutions per site. New sequences from the present study are indicated in boldface. The names of the sequences include the following information when available: (1) virus name, (2) Genbank accession number, (3) species of cetacean, (4) year of stranding and (5) geographical area. Abbreviations for each part of the sequence name are as follows: (1) CeMV, *Cetacean morbillivirus* (PMV, porpoise morbillivirus; DMV, dolphin morbillivirus; PWMV, pilot whale morbillivirus); PPRV, *Peste-des-petits-ruminants virus*; RPV, *Rinderpest virus*, CDV, *Canine distemper virus*; PDV, *Phocine distemper virus*; MeV, *Measles virus*; (3) Sc, *Stenella coeruleoalba*; Gme, *Globicephala melas*; La, *Lagenorhynchus albirostris*; Kb, *Kogia breviceps*; Tt, *Tursiops truncatus*; Pp, *Phocoena phocoena*; Gma, *Globicephala macrorhynchus*; (5) At, Atlantic Ocean; Me, Mediterranean Sea; No, North Sea; Pa, Pacific Ocean. Upper panel: The phylogram of P is based on 317 bp. The scale bar indicates phylogenetic distance. The strain PMV Pp/1990/No comes from Barrett et al. (1993). Lower panel: The phylogram was constructed for the 9050 bp sequenced in this study. The new sequences from this study were compared with the DMV_Sc/1990 sequence, and PPRV (*Peste-des-petits-ruminants virus*) was added as an outgroup member.

Acc. Nos. EU124652, HQ829972 and HQ829973) obtained from 3 animals (2 *S. coeruleoalba* and 1 *G. melas*) (Raga et al., 2008 and this study) was 0.000, which was also the value determined for the DMV P gene sequences (GenBank Acc. Nos. EU039963 and HQ829973) from 18 animals (10 *S. coeruleoalba*, 7 *G. melas* and 1 *T. truncatus*) (Fernández et al., 2008; Keck et al., 2010 and this study). The p-distance of both N and P gene sequences from the Spanish strain of 1990 (GenBank Acc. No. AJ608288) was 0.013.

Comparison of the entire length (9050 bp) of DMV_Gme/2007 (GenBank Acc. No. HQ829972) and DMV_Sc/2007 (GenBank Acc. No. HQ829973) showed an overall nucleotide and amino acid p-distance of 0.001 (99.9% similarity), indicating that they are more similar to each other than to DMV_Sc/1990, with nucleotide p-distances of 0.006 and 0.007, respectively (Table 2).

The sequences obtained allowed the construction of a phylogenetic tree based on 317 bp of the P gene (Fig. 1, upper panel). This tree indicates that DMV_Gme/2007 and DMV_Sc/2007 are closer to DMV_Sc/1990 than to the other DMV strains already sequenced. A phylogenetic tree based on 9050 bp of the N, P, M, F and H genes

(Fig. 1, lower panel) showed that DMV_Sc/1990 is closer to the root of the DMV cluster (0.0005 nucleotide substitutions per site) than to the node of bifurcation of the DMV_Gme/2007 and DMV_Sc/2007 sequences (0.0034 nucleotide substitutions per site).

Comparison of the DMV_Sc/1990, DMV_Gme/2007 and DMV_Sc/2007 sequences reveals nucleotide mutations at 63 different locations, with 55 (87%) shared between DMV_Gme/2007 and DMV_Sc/2007, three (5%) present only in DMV_Gme/2007, and five (8%) present only in DMV_Sc/2007 (Fig. 2). Of these 63 nucleotide mutations, 18 (29%) are in untranslated regions (UTRs) (Fig. 2). Of the 45 mutations in coding regions, 13 (29%) result in amino acid changes. Of these 13, 10 (77%) are identical between DMV_Gme/2007 and DMV_Sc/2007, one (8%) is present only in DMV_Gme/2007 and two (15%) are present only in DMV_Sc/2007 (Fig. 2).

4. Discussion

Based on the partial sequences of the N and P genes totaling 577 bp, the identity of DMV_Gme/2007 and DMV_Sc/2007 with

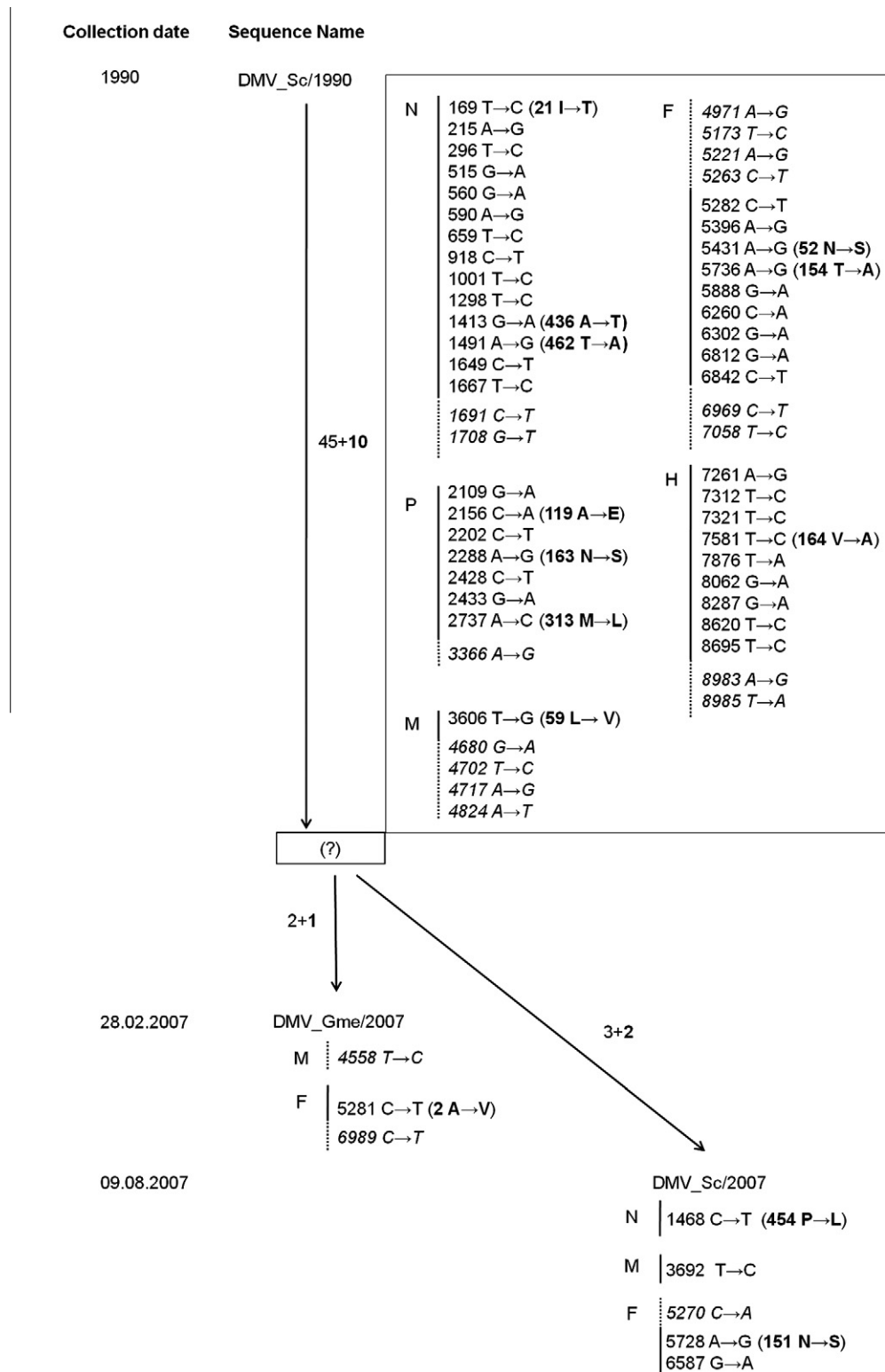


Fig. 2. Relationship among the three sequences of DMV responsible for the outbreaks affecting cetaceans in the Mediterranean Sea (DMV_Sc/1990, DMV_Gme/2007 and DMV_Sc/2007). Numbers of expressed mutations (in bold) and silent mutations are shown; the mutated nucleotide is shown in italics. The protein gene affected by each mutation is indicated using the same protein abbreviations as in Table 2. Continuous lines indicate coding sequences (CDS), while broken lines indicate untranslated regions (UTRs). The “?” indicates a hypothetical sequence with the 55 nucleotide mutations shared by both DMV_Gme/2007 and DMV_Sc/2007 sequences, based on DMV_Sc/1990 as a reference. Abbreviations of the amino acid names are as follows: I, isoleucine; T, threonine; A, alanine; E, glutamic acid; N, asparagine; S, serine; M, methionine; L, leucine; V, valine; S, serine; P, proline.

the 2006–2008 DMV sequences from other host species and other stranding dates is 100%, and it is 98.7% with DMV_Sc/1990. Based

on the nearly complete genomes (9050 bp), the strains DMV_Gme/2007 and DMV_Sc/2007 showed 99.9% similarity with each other.

As a consequence, they should be considered the same virus, which is in turn 99.4% and 99.3% similar to the DMV_Sc/1990 sequence, respectively.

The phylogenetic analysis (Fig. 1) suggests that DMV_Sc/1990 is closer to the ancestor of the Mediterranean DMV clade than to either DMV_Gme/2007 or DMV_Sc/2007, which is also supported by the timing of the outbreaks. These findings, together with the fact that the 1990–1992 and 2006–2008 outbreaks affected the same area (Mediterranean Sea), suggest that the two DMV sequences from 2007 evolved from DMV_Sc/1990.

The emergence of morbilliviruses in cetaceans and pinnipeds has attracted significant attention from experts in wildlife diseases and the wider scientific community. As a result of research into the causes of this emergence in the 1990–1992 Mediterranean epidemic, the disease and mortality surveillance system in place all over the Mediterranean Sea basin and in countries facing the Mediterranean Sea was better in 2006–2008 than in 1990–1992. Thus, in 1994, 2 years after the 1990–1992 DMV outbreak, MI was detected in four bottlenose dolphins that died in the Western Mediterranean (Italy and Israel) (Barrett et al., 1995; Tsur et al., 1997), but the CeMV involved was not identified (Kennedy, 1998). In the 2006–2008 outbreak, bottlenose dolphins were detected during the outbreak itself, and molecular studies implicated DMV (Keck et al., 2010). As a result of the inadequate disease and mortality surveillance system before the 2006–2008 outbreak, it is possible that the DMV in the 1990–1992 Mediterranean outbreak was pathogenic for other cetacean species in addition to striped dolphins.

The DMV outbreak in the Mediterranean in 2006 began in the strait of Gibraltar, and *G. melas* were found stranded on the Atlantic and Mediterranean sides (De Stephanis et al., 2009; Fernández et al., 2008). Moreover, Atlantic *G. melas* is a suspected morbillivirus reservoir host for other cetacean species (Duignan et al., 1995). Thus, it is reasonable to suspect that the outbreak had an Atlantic origin (Raga et al., 2008). Later, in January 2007, a white-beaked dolphin (*Lagenorhynchus albirostris*) affected by DMV was found stranded in the North Sea (Wohlsein et al., 2007). If DMV was circulating in the North Sea, it is possible that infected individuals from that region, possibly long-finned pilot whales, spread the virus to striped dolphins in the Mediterranean (Van Bressem et al., 2009). However, three observations seem to be in conflict with this hypothesis. First, phylogenetic analysis indicates that DMV_Sc/1990 may have given rise to DMV_Gme/2007 and DMV_Sc/2007, while the sequence detected in *L. albirostris* belongs to a different cluster (Fig. 1, upper panel). Second, the epidemic in the Mediterranean Sea in 2006–2008 involved the death of at least 60 long-finned pilot whales (De Stephanis et al., 2009; Fernández et al., 2008) and 200 striped dolphins (Keck et al., 2010; Raga et al., 2008). In contrast, only a single white-beaked dolphin was affected in the North Sea. This may indicate that no direct relationship exists between the Mediterranean outbreaks and the presence of DMV in the North Sea. Third, DMV may be emergent for *G. melas*, since molecular studies in Atlantic *G. spp.* before 2006 showed evidence of only PWMV (Taubenberger et al., 2000) and PWMV-like morbillivirus (Bellière et al., 2011). Thus, Atlantic *G. melas* may not be a reservoir for DMV. The idea that pilot whales were not infected or even exposed during the 1990–1992 morbillivirus epidemic in the Mediterranean Sea, while plausible, is hard to imagine. Nevertheless, in the 2006–2008 outbreak, animals of all ages were affected and the majority were adults, suggesting that they were immunologically naïve and that DMV is emergent in long-finned pilot whales (Fernández et al., 2008).

One possibility to explain the sequence similarity between the strains from 1990 and 2007 is that DMV_Sc/1990 in striped dolphins gave rise to DMV_Gme/2007, pathogenic for long-finned pilot whales. Subsequently the latter strain evolved into DMV_Sc/

2007, pathogenic for striped dolphins. Two lines of evidence are in conflict with this hypothesis. First, it is more likely that the DMV_Sc/1990 strain evolved in the host from which it was initially isolated (striped dolphins), and subsequently gave rise to two new strains before the outbreak in 2006–2008. One of these two strains affected long-finned pilot whales. Second, the pilot whales-to-dolphins transfer hypothesis requires three reversions in the DMV_Sc/2007 strain: two silent reversions at position 4558 (C→T) and 6989 (T→C), and one expressed reversion at position 5281 (T→C), which leads to a substitution of the second amino acid (V→A) in the F protein. However, reversions are extremely rare (Neidhart, 2004) and even more so in the case of expressed mutations, since they may affect protein function. Thus, the mutational analysis, although inconclusive, suggests a Mediterranean DMV virus that existed prior to the outbreak and that differs by 55 substitutions from the DMV_Sc/1990, which may have diverged into striped dolphins before the 2006 epidemic, leading to DMV_Gme/2007 and DMV_Sc/2007, which are 99.9% identical to each other (Fig. 2).

The relationship among DMV_Sc/1990, DMV_Gme/2007 and DMV_Sc/2007 (Fig. 2) allows analysis of the location of nucleotide and amino acid mutations. Among the five genes for structural proteins compared with DMV_Sc/1990, the N gene showed the highest mutation rate, although it was still low (amino acid p-distance, 0.006–0.008) (Table 2). This variation is due to the existence of a C-terminal hypervariable region, present in all species of the genus (Blixenkrone-Møller et al., 1994). Apart from the mutation at position 21 that is located in a relatively well-conserved region (Blixenkrone-Møller et al., 1994), all of the mutations lie in the C-terminal hypervariable region (Blixenkrone-Møller et al., 1994), which extends from residue 400 to 518 (Bolt et al., 1994) (Fig. 2).

In the P antigen, three amino acid changes have been observed (119 A→E; 163 N→S; 313 M→L) (Fig. 2). However, the P sequence from a striped dolphin stranded in the 1990 outbreak has E and L residues at positions 119 and 313, respectively (Bolt et al., 1995), similar to our results. Thus, it is possible that only one expressed mutation (163 N→S) differentiates the P antigen in the 2007 DMV strains (this study) from that of the 1990 DMV strains (Bolt et al., 1995; Rima et al., 2005).

The M and H genes showed the highest identity among the amino acid sequences compared: 100% identity between the 2007 strains, and 99.7–99.8% identity with DMV_Sc/1990 (Table 2). In the M gene, the only amino acid mutation (59 L→V) is located outside of a highly conserved region (Bolt et al., 1994). In the H gene, the only expressed mutation (164 V→A) is located outside the highly conserved hydrophobic domain between residues 29 and 61, which anchors the protein to the virus membrane (Blixenkrone-Møller et al., 1996). In MeV, the H glycoprotein stimulates the immune response, probably primarily by triggering the production of neutralizing antibodies (Rima et al., 1997). Rota et al. (1996) defined virus strains as a single MeV genotype on the basis of epidemiological information and sequence data; they assigned strains to the same genotype when H sequences were within 0.5% nucleotide divergence. Applying this nucleotide divergence cutoff to DMV_Gme/2007 and DMV_Sc/2007, which show 0.0% nucleotide divergence from each other and 0.5% divergence from DMV_Sc/1990 (Table 2), strengthens the idea that the two 2007 strains belong to the same virus, and that the three strains belong to a single genotype indigenous to the Mediterranean Sea (Rota et al., 1996).

Four expressed mutations were found in the F gene: (2 A→V), (52 N→S), (151 N→S) and 154 (T→A). The (2 A→V) mutation in the DMV_Gme/2007 sequence (nt 5281, Fig. 2) is located in the signal peptide sequence (Bolt et al., 1994). No other published morbillivirus F sequence contains a valine at this position. This is a species-specific region among morbilliviruses, probably because its functions are linked to those of the host cell (Bolt et al., 1994;

Meyer and Diallo, 1995); thus, this species-specific region reflects the fact that a given morbillivirus is specific for a given host. Since this mutation is missing in the DMV_Sc/2007 sequence, it may be associated with host adaptation to long-finned pilot whales.

The remaining three expressed mutations were found at positions 52, 151 and 154 (Fig. 2). They are located between the N-terminus of F₂ and the start of the anchor sequence (residues 26–490) (Bolt et al., 1994), which is considered a semi-conserved region among *Morbillivirus* species (Meyer and Diallo, 1995).

Untranslated sequences (UTRs) are strongly conserved between DMV and other morbilliviruses (Bolt et al., 1994; Curran et al., 1992; Sidhu et al., 1993). None of the nucleotide mutations within UTRs in the present study is localized within strongly conserved regions (Fig. 2), except for the nucleotide T→C mutation at position 7058. This substitution lies in the polyadenylation signal at the end of the F gene (nt 7052–7067) (Bolt et al., 1994) in both DMV_Gme/2007 and DMV_Sc/2007, which can be taken as further evidence that they are the same virus. Moreover, UTRs show the highest nucleotide p-distances (Table 2), with values of 0.011 and 0.012 between DMV_Sc/1990 and the two 2007 DMV strains. This probably reflects less selective pressure on UTRs.

5. Conclusions

This is the first comparison among nearly complete DMV genomes obtained from different outbreaks and different host species. The molecular data indicate that the two sequences obtained from a long-finned pilot whale and a striped dolphin stranded in 2007 share 99.9% similarity and should be considered the same virus, and that this virus may have a Mediterranean origin. In Mediterranean striped dolphins, a pre-epidemic strain may have evolved from the 1990 DMV Spanish strain, subsequently passing into long-finned pilot whales. The distribution of substitutions indicates that further molecular studies are needed to understand this evolution, particularly studies of the N-terminal region of the F protein. We found a non-synonymous substitution in this region, which may have helped DMV spread from one host to another.

As causes for the emergence of DMV in pilot whales and its resurgence in striped dolphins in the Mediterranean Sea remain unknown and are likely to be multifactorial, future studies should examine the possible existence of factors that may determine susceptibility to MI, including host genotypes, and immunological and environmental factors such as temperature changes.

Acknowledgments

We would like to thank Fernando Bayón, who provided us with the samples used in this study. We are also grateful to María José Gómez-Nieves, Elena Neves and Verónica Nogal for their technical assistance. This work was partially funded by the Project CGL2009-08125 of the Spanish Government's National Research Plan, and by the Agreement INIA-MARM CC08-020.

References

Aguilar, A., Raga, J.A., 1993. The striped dolphin epizootic in the Mediterranean Sea. *Ambio* 22, 524–528.

Barrett, T., Blixenkrone-Møller, M., Di Guardo, G., Domingo, M., Duignan, P., Hall, A., Mamaev, L., Osterhaus, A.D., 1995. Morbilliviruses in aquatic mammals: report on round table discussion. *Vet. Microbiol.* 44, 261–265.

Barrett, T., Visser, I.K., Mamaev, L., Goatley, L., van Bresse, M.F., Osterhaus, A.D., 1993. Dolphin and porpoise morbilliviruses are genetically distinct from phocine distemper virus. *Virology* 193, 1010–1012.

Bellièvre, E.N., Esperón, F., Arbelo, M., Muñoz, M.J., Fernández, A., Sánchez-Vizcaíno, J.M., 2010. Presence of herpesvirus in striped dolphins stranded during the *Cetacean morbillivirus* epizootic along the Mediterranean Spanish coast in 2007. *Arch. Virol.* 155, 1307–1311.

Bellièvre, E.N., Esperón, F., Fernández, A., Arbelo, M., Muñoz, M.J., Sánchez-Vizcaíno, J.M., 2011. Phylogenetic analysis of a new *Cetacean morbillivirus* from a short-finned pilot whale stranded in the Canary Islands. *Res. Vet. Sci.* 90, 324–328.

Birkun, J., Kuiken, T., Krivokhizhin, S., Haines, D.M., Osterhaus, A.D., van de Bildt, M.W., Joiris, C.R., Siebert, U., 1999. Epizootic of morbilliviral disease in common dolphins (*Delphinus delphis ponticus*) from the Black sea. *Vet. Rec.* 144, 85–92.

Blixenkrone-Møller, M., Bolt, G., Gottschalk, E., Kenter, M., 1994. Comparative analysis of the gene encoding the nucleocapsid protein of dolphin morbillivirus reveals its distant evolutionary relationship to measles virus and ruminant morbilliviruses. *J. Gen. Virol.* 75 (Pt 10), 2829–2834.

Blixenkrone-Møller, M., Bolt, G., Jensen, T.D., Harder, T., Svansson, V., 1996. Comparative analysis of the attachment protein gene (H) of dolphin morbillivirus. *Virus Res.* 40, 47–55.

Bolt, G., Alexandersen, S., Blixenkrone-Møller, M., 1995. The phosphoprotein gene of a dolphin morbillivirus isolate exhibits genomic variation at the editing site. *J. Gen. Virol.* 76 (Pt 12), 3051–3058.

Bolt, G., Blixenkrone-Møller, M., Gottschalk, E., Wishaupt, R.G., Welsh, M.J., Earle, J.A., Rima, B.K., 1994. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the matrix (M) and fusion (F) protein genes of *Cetacean morbilliviruses* isolated from a porpoise and a dolphin. *Virus Res.* 34, 291–304.

Cosby, S.L., McQuaid, S., Duffy, N., Lyons, C., Rima, B.K., Allan, G.M., McCullough, S.J., Kennedy, S., Smyth, J.A., McNeilly, F., Craig, C., Orvell, C., 1988. Characterization of a seal morbillivirus. *Nature* 336, 115–116.

Curran, M.D., O'Loan, D., Kennedy, S., Rima, B.K., 1992. Molecular characterization of phocine distemper virus: gene order and sequence of the gene encoding the attachment (H) protein. *J. Gen. Virol.* 73 (Pt 5), 1189–1194.

De Stephanis, R., Verborgh, P., Gauffier, P., 2009. Las poblaciones de calderón común *Globicephala melas* en el Estrecho de Gibraltar. *MIGRES Revista de Ecología* 1, 37–45.

Domingo, M., Ferrer, L., Pumarola, M., Marco, A., Plana, J., Kennedy, S., McAliskey, M., Rima, B.K., 1990. Morbillivirus in dolphins. *Nature* 348, 21.

Duignan, P.J., House, C., Geraci, J.R., Early, G., Copland, H.G., Walsh, M.T., Bossart, G.D., Cray, C., Sadove, S., St. Aubin, D.J., Moore, M., 1995. Morbillivirus infection in two species of pilot whales (*Globicephala* sp.) from the western Atlantic. *Marine Mammal Sci.* 11, 150–162.

Fernández, A., Esperón, F., Herraéz, P., de Los Monteros, A.E., Clavel, C., Bernabé, A., Sánchez-Vizcaíno, J.M., Verborgh, P., DeStephanis, R., Toledano, F., Bayón, A., 2008. Morbillivirus and pilot whale deaths, Mediterranean Sea. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 792–794.

ICTV, 2002. ICTVdb index of viruses (on line). International Committee on Taxonomy of Viruses, UK. Available from: <<http://www.ictvdb.rothamsted.ac.uk/ictv/index.htm>>.

Keck, N., Kwiatek, O., Dhermain, F., Dupraz, F., Boulet, H., Danes, C., Laprie, C., Perrin, A., Godenir, J., Micout, L., Libeau, G., 2010. Resurgence of Morbillivirus infection in Mediterranean dolphins off the French coast. *Vet. Rec.* 166, 654–655.

Kennedy, S., 1998. Morbillivirus infections in aquatic mammals. *J. Comp. Pathol.* 119, 201–225.

Kennedy, S., Smyth, J.A., Cush, P.F., McCullough, S.J., Allan, G.M., McQuaid, S., 1988. Viral distemper now found in porpoises. *Nature* 336, 21.

Mahy, B.W.J., Barrett, T., Evans, S., Anderson, E.C., Bostock, C.J., 1988. Characterization of a seal morbillivirus. *Nature* 336, 115.

Meyer, G., Diallo, A., 1995. The nucleotide sequence of the fusion protein gene of the peste des petits ruminants virus: the long untranslated region in the 5'-end of the F-protein gene of morbilliviruses seems to be specific to each virus. *Virus Res.* 37, 23–35.

Neidhart, F.C., 2004. Chapter IV: bacterial genetics. In: Sherris, J.C., Ryan, K.J., Ray, C.G. (Eds.), *Medical Microbiology: An Introduction to Infectious Diseases*, Fourth ed. McGraw-Hill Medical, USA, pp. 53–75.

Osterhaus, A.D., Visser, I.K., de Swart, R.L., van Bresse, M.F., van de Bildt, M.W., Orvell, C., Barrett, T., Raga, J.A., 1992. Morbillivirus threat to Mediterranean monk seals? *Vet. Rec.* 130, 141–142.

Raga, J.A., Banyard, A., Domingo, M., Corteyn, M., Van Bresse, M.F., Fernandez, M., Aznar, F.J., Barrett, T., 2008. Dolphin morbillivirus epizootic resurgence, Mediterranean Sea. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 471–473.

Rima, B.K., Collin, A.M., Earle, J.A., 2005. Completion of the sequence of a *Cetacean morbillivirus* and comparative analysis of the complete genome sequences of four morbilliviruses. *Virus Genes* 30, 113–119.

Rima, B.K., Earle, J.A., Baczkó, K., ter Meulen, V., Liebert, U.G., Carstens, C., Carabana, J., Caballero, M., Celma, M.L., Fernandez-Munoz, R., 1997. Sequence divergence of measles virus haemagglutinin during natural evolution and adaptation to cell culture. *J. Gen. Virol.* 78 (Pt 1), 97–106.

Rota, J.S., Heath, J.L., Rota, P.A., King, G.E., Celma, M.L., Carabana, J., Fernandez-Munoz, R., Brown, D., Jin, L., Bellini, W.J., 1996. Molecular epidemiology of measles virus: identification of pathways of transmission and implications for measles elimination. *J. Infect. Dis.* 173, 32–37.

Sidhu, M.S., Husar, W., Cook, S.D., Dowling, P.C., Udem, S.A., 1993. Canine distemper terminal and intergenic non-protein coding nucleotide sequences: completion of the entire CDV genome sequence. *Virology* 193, 66–72.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596–1599.

Taubenberger, J.K., Tsai, M.M., Atkin, T.J., Fanning, T.G., Krafft, A.E., Moeller, R.B., Kodosi, S.E., Mense, M.G., Lipscomb, T.P., 2000. Molecular genetic evidence of a novel morbillivirus in a long-finned pilot whale (*Globicephalus melas*). *Emerg. Infect. Dis.* 6, 42–45.

- Tsur, I., Goffman, O., Yakobsen, B., Moffett, D., Kennedy, S., 1997. Morbillivirus infection in a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) from the Mediterranean Sea. *Eur. J. Vet. Pathol.* 2, 83–85.
- Van Bresse, M., Waerebeek, K.V., Jepson, P.D., Raga, J.A., Duignan, P.J., Nielsen, O., Di Benedetto, A.P., Siciliano, S., Ramos, R., Kant, W., Peddemors, V., Kinoshita, R., Ross, P.S., Lopez-Fernandez, A., Evans, K., Crespo, E., Barrett, T., 2001. An insight into the epidemiology of dolphin morbillivirus worldwide. *Vet. Microbiol.* 81, 287–304.
- Van Bresse, M.F., Raga, J.A., Di Guardo, G., Jepson, P.D., Duignan, P.J., Siebert, U., Barrett, T., de Oliveira Santos, M.C., Moreno, I.B., Siciliano, S., 2009. Emerging infectious diseases in cetaceans worldwide and the possible role of environmental stressors. *Dis. Aquat. Org.* 86, 143–157.
- van de Bildt, M.W., Kuiken, T., Osterhaus, A.D., 2005. *Cetacean morbilliviruses* are phylogenetically divergent. *Arch. Virol.* 150, 577–583.
- Wohlsein, P., Puff, C., Kreutzer, M., Siebert, U., Baumgartner, W., 2007. Distemper in a dolphin. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 1959–1961.

III Presencia de herpesvirus en delfines listados varados durante la epizootia de morbillivirus de cetáceo a lo largo de la costa mediterránea española en 2007

Bellière EN, Esperón F, Arbelo M, Muñoz MJ, Fernández A, Sánchez-Vizcaíno JM (2010) Presence of herpesvirus in striped dolphins stranded during the cetacean morbillivirus epizootic along the Mediterranean Spanish coast in 2007. Arch Virol, 155:1307-1311.

Un rastreo de herpesvirus (HV) se llevó a cabo utilizando un banco de tejidos obtenido del episodio de mortalidad por el morbillivirus de cetáceo (CeMV) que tuvo lugar a lo largo de la costa española mediterránea en 2007. Un total de 14 cetáceos, incluidos seis *G. melas* y ocho *S. coeruleoalba*, se estudiaron mediante histopatología y análisis molecular para detectar HV y CeMV. En cinco de los ocho *S. coeruleoalba* (62,5 %) infectados por CeMV, ocho nuevas secuencias de HV se detectaron también. No se encontraron lesiones compatibles con HV en ninguno de los *S. coeruleoalba* coinfectados, lo que puede indicar que los HV no contribuyeron a la mortalidad del brote por CeMV. Es la primera vez que se describe infección por HV en cualquier cetáceo del mar Mediterráneo.

Presence of herpesvirus in striped dolphins stranded during the cetacean morbillivirus epizootic along the Mediterranean Spanish coast in 2007

Edwige N. Bellière · Fernando Esperón ·
Manuel Arbelo · María J. Muñoz ·
Antonio Fernández · José M. Sánchez-Vizcaíno

Received: 7 January 2010 / Accepted: 10 May 2010 / Published online: 22 May 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract A screening for herpesvirus (HV) was carried out using a tissue bank obtained from the cetacean morbillivirus (CeMV) mortality episode that occurred along the Mediterranean Spanish coast in 2007. A total of 14 cetaceans, including six long-finned pilot whales and eight striped dolphins, were studied using histopathology and molecular analysis to detect HV and CeMV. In five of the eight dolphins (62.5%) infected with CeMV, eight novel HV sequences were also detected. No HV lesions were found in any of the coinfecting dolphins, which may indicate that HV did not contribute to the mortality in the CeMV outbreak. This is the first report of HV infection in any cetacean from the Mediterranean Sea.

Herpesviruses (HV) belong to the family *Herpesviridae*, which is broken down into three subfamilies: *Alpha*-, *Beta*-, and *Gammaherpesvirinae*. Herpesviruses occur widely in nature, and they infect a large number of animal species [17]. However, little is known about their distribution in cetaceans. Although they were successfully cultured in the laboratory in one recent study [20], only partial sequences

of the polymerase and terminase genes are available for the herpesviruses that affect cetaceans, which limits our ability to classify them into species and understand their epidemiology. Pathological and molecular studies have identified nucleotide sequences of alphaherpesvirus (α -HV) in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*), where the virus produced systemic infections [2], cutaneous lesions [19] and non-purulent encephalitis. Gammaherpesvirus (γ -HV) sequences have been identified in mucosal lesions in *Tursiops truncatus*, Risso's dolphin (*Grampus griseus*), the dwarf sperm whale (*Kogia sima*) and Blainville's beaked whale (*Mesoplodon densirostris*) [18, 19].

In contrast to the sparse information available about HV in cetaceans, cetacean morbillivirus (*Cetacean morbillivirus*, genus *Morbillivirus*, family *Paramyxoviridae*) is known to be highly pathogenic in these animals. In fact, it has been responsible for several episodes of mass mortality in cetaceans worldwide over the last 20 years [5]. In 2006–2007, an epizootic of the dolphin morbillivirus (DMV) strain belonging to the cetacean morbillivirus (CeMV) in the Mediterranean caused high mortality among long-finned pilot whales (*Globicephala melas*) [10] and striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) [16].

In order to understand more about HV in cetaceans and to begin to investigate a possible overlap in the epidemiology of HV and CeMV, we screened for both types of virus in the cetacean tissue bank obtained during the CeMV epizootic of 2006–2007, which affected long-finned pilot whales and striped dolphins. In parallel, a complete histopathological study was made to detect lesions compatible with these viral infections.

Tissues from six pilot whales (29 tissues available) and eight striped dolphins (38 tissues available) stranded on the southern Spanish coast during the 2006–2007 episode of mass mortality (Table 1) were frozen at -70°C and

E. N. Bellière (✉) · F. Esperón · M. J. Muñoz
National Institute for Agricultural
and Food Research and Technology,
Valdeolmos, Spain
e-mail: nina.belliere@inia.es

M. Arbelo · A. Fernández
Institute of Animal Health,
University of Las Palmas de Gran Canaria,
Las Palmas, Spain

J. M. Sánchez-Vizcaíno
Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

Table 1 Animals and tissues tested in this study

ID	Sp.	Month of stranding (2007)	Tissues analyzed for CeMV and HV	Tissues positive for HV
179	Gm	February	Kidney, liver, lung, spleen	
180	Gm	February	Kidney, liver, lung, spleen	
181	Gm	February	Brain, kidney, liver, lung, spleen	
182	Gm	February	Kidney, liver, lung, spleen	
183	Gm	March	Brain, kidney, lung, luteous body, lymph node, mammary gland, muscle, spleen	
186	Gm	March	Brain, kidney, liver, lung	
185	Sc	March	Brain, kidney, liver, lung	Kidney, liver
191	Sc	April	Brain, intestine, kidney, lung, lymph node, spleen	Intestine, lymph node
193	Sc	April	Brain, spinal cord	
319	Sc	August	Brain, kidney, liver, lung, lymph node, spleen	Brain, kidney, liver, lung, lymph node, spleen
320	Sc	August	Brain, kidney, liver, lung, lymph node, spleen	Lung
322	Sc	August	Brain, kidney, liver, lung, lymph node, spleen, whole blood	
323	Sc	September	Lung	
324	Sc	September	Brain, kidney, liver, lung, ovary, urinary bladder	Liver, ovary

Tissues from striped dolphins that tested positive for herpesvirus (HV) are indicated in boldface in cases where they tested positive for HV and cetacean morbillivirus (CeMV) simultaneously

ID animal reference, Sp. Species name, Gm *Globicephala melas*, Sc *Stenella coeruleoalba*

analyzed for CeMV by reverse transcription-PCR (RT-PCR) and for HV by PCR.

Molecular detection of CeMV was performed using real-time RT-PCR (RT-rt PCR) based on SYBR Green dye. The reaction amplifies a conserved, 192 bp region in the fusion protein gene using forward primer CeMV-FuF (5'-GGCACCATAATTAGCCAGGA-3') and reverse primer CeMV-FuR (5'-GCCCAGATTTGTGCCTACAT-3'). Herpesvirus detection was performed by universal nested PCR as described previously [21]. The reaction amplifies a region of the DNA polymerase gene that is conserved in members of the family *Herpesviridae*, allowing the virus from which the sequence originates to be identified as known or novel and to tentatively assign the virus to a herpesvirus subfamily (and in some instances, also to a genus) [21]. Purified DNA fragments from HV-positive samples were cloned into the plasmid vector pGEM[®]-T (Promega Corporation) following the manufacturer's instructions and sequenced with the corresponding T7 primer (forward) and SP6 primer (reverse).

Diagnoses of CeMV infection were confirmed by sequencing the amplicons and using BLAST searches to compare the sequences with those in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Cloned fragments of HV DNA were translated into protein sequences, which were aligned using ClustalW software. The alignment was used to construct a neighbor-joining tree based on p-distance.

The results of sequencing confirmed the presence of CeMV (DMV strain) in all 14 animals tested. In addition,

five of the eight (62.5%) striped dolphins (ID numbers 185, 191, 319, 320 and 324) also tested positive for HV infection (Table 1). No HV was identified in any of the long-finned pilot whales. All of the dolphins that were positive for HV showed the presence of both CeMV and HV in at least one tissue. In addition, all six of the tissues from animal 319 were positive for both CeMV and HV.

Cloned fragments of HV DNA ranged in size from 166 to 220 nucleotides, corresponding to hypothetical protein sequences of 54–73 amino acids, excluding primer-binding sites, and an amino acid alignment is shown in Fig. 1. Eight novel sequences of HV were found (Table 1), and the consensus tree (Fig. 2) divided them into two groups: one containing seven α -HV sequences from animals 185, 191, 319, 320 and 324, and another containing a γ -HV sequence from animal 191. Two different HV sequences were detected simultaneously in dolphins 185, 191, and 324 (Fig. 2). In the case of dolphin 191, the two herpesvirus sequences belong to different subfamilies: α -HV and γ -HV.

Histopathological and immunohistochemical studies were carried out on the animals. Severe bronchointerstitial pneumonia with the frequent presence of syncytial cells, necrotizing lymphadenitis and non-purulent encephalitis were the most common histopathological findings, which are highly consistent with morbillivirus infection [6]. No lesions consistent with herpesvirus infection were detected in any animal.

To our knowledge, this is the first report of coinfection with CeMV and another virus in cetaceans. CeMV

AF196646_Tt/At/USA	GLLPCLQIAA	TVTTIGRDM	LRTRDYLH	HAH	-WATAERLVA	D-FDGA	AAAL	LASP
AY608707_Tt/At/GER	..P.....
AY949832_Tt/At/USA	..P.....
324_Ov/GU068981A.
191_I/GQ888671EP.
320_Lu/GQ888674Q.....R.....V.....P.
185_Li/GQ888670P...S.....SR.....R.Q.A.GD.Y.SP	APT.
324_Li/GQ888675P...S.....SR.....R.Q.A.GD.Y.SP	APT.
AY757301_Tt/At/USAP...S.....SR.....R.Q.A.GD.Y.SP	APIS
DQ295063_Tt/At/GERP...S.....SR.....R.Q.AVGD.Y.SP	APIS
185_K/GQ888669PV...S.....K.Q.....DR.....P.QC.IS	PAVSEV. IPGT
319_B-K-Li-Ln-Lu-S/GQ888673PV...Q.....DR.....E.LPC.ISPEVSNM.	TPQT
DQ295064_Tt/At/GERPV...Q.....DR.....P.V.....TS.....	PEVVSMT IPNT
AF245443_Tt/At/USAPV...Q.....DR.....P.V.....TS.....	PEVVSMT IPNT
AY949830_Ks/At/USAK..ESQ..C.E.SKKFIE.INHSKL.EIG	RAVPDTCENA	DERV	
AY949828_Md/At/USA	..M...K..E	...LQ..C.	...E.SKKFIE.I	...DYRRL.E	...IG	QTVTD.DENS	EFKV	
AY803337_Md/At/USA	..M...K..E	...LQ..C.	...E.SKKFIE.I	...DYRRL.E	...IG	QTVTD.DENS	EFKV	
DQ288667_Tt/At/USAK..E	...LQ..R.	...E.SKKFIE.I	...DRRL.E	...G	HAVA..DGDA	EFKV	
AY952776_Tt/At/USAK..E	...LQ..R.	...E.SKKFIE.I	...DRRL.E	...G	HVA..DGDA	EFKV	
AY949831_Tt/At/USAK..E	...LQ..R.	...E.SKRFFIE.I	...NHRRL.E	...IG	HAVA..DGNA	EFRV	
AY952777_Tt/At/USAK..E	...LQ..R.	...E.SKRFFIE.I	...NHRRL.E	...IG	HAVA..DGNA	EFRV	
AY952778_Tt/At/USAK..E	...LQ..R.	...E.SKRFFIE.I	...NHRRL.E	...IG	HAVA..DGNA	EFRV	
AY952779_Tt/At/USAK..E	...LQ..R.	...E.SKRFFIE.I	...NHRRL.E	...IG	HAVA..DGNA	EFRV	
191_Ln/GQ888672	..M...K..E	...LQ..C.	...E.SKKFIE.I	...DHRRL.E	...IG	HAVA..DGDA	KLRV	
DQ288666_Gg/At/USA	..M...K..E	...LQ..C.	...E.SKMFFIE.I	...NHRRL.E	...IG	HAVAD.DRDA	EFKV	

Fig. 1 Multiple alignment of amino acid sequences from cetacean herpesvirus already published and the eight putative novel cetacean herpesvirus described in this study. The name of each sequence indicates the GenBank accession number of its nucleotide sequence, the species of host cetacean (Gg, *Grampus griseus*; Ks, *Kogia sima*; Md, *Mesoplodon densirostris*; Tt, *Tursiops truncatus*) and the

geographical location (At Atlantic Ocean, GER Germany, USA United States of America). The names of the sequences identified in the present study include the individual reference number, the tissues in which they were detected (B brain, I intestine, K kidney, Li liver, Ln lymph node, Lu lung, S spleen) and the GenBank accession number

sequences were detected in all 14 animals tested, and the morbilliviral antigen was detected immunohistochemically in all of the striped dolphins. In previous work, the presence of the antigen was detected in the same pilot whales [10]. In five of the eight striped dolphins (62.5%), HV sequences were also detected, and these sequences have not yet been reported in the literature.

The animals showed pathology consistent with CeMV, but in no case were HV lesions observed. These results suggest that HV did not play a major role in the mortality of dolphins in the 2007 epizootic in the Mediterranean. Similarly, in seals, coinfection of herpesvirus and morbillivirus was described in a 1988 morbillivirus epizootic in the North Sea, but HV did not appear to be a major factor in the outbreak [7, 8]. This raises the question of how HV infection was able to occur in the CeMV-infected animals in these epizootics.

One possible explanation is that CeMV immunosuppressed the animals. It is at least equally likely that the putative immunosuppression enabled herpesviruses to infect them, or reactivated the individuals' own, latent herpesviruses [2, 9]. CeMV has been shown in vitro to cause immunosuppression by inhibiting lymphocyte proliferation [13]. During the DMV epizootic of striped dolphins in 1990, pathological agents such as *Aspergillus fumigatus* and *Toxoplasma gondii* were identified as secondary pathogens whose infection was attributed to the immunosuppressive effects of CeMV on the animals [7]. However, this interpretation is complicated by the fact that

the animals in the 1990 epizootic contained abnormally high levels of polychlorinated biphenyls (PCBs) [1], which may induce immunosuppression [3, 11]. Indeed, the high PCB concentrations observed have been suggested as contributing factors in the spread and severity of the epizootic [14]. It may be, then, that high levels of PCBs and CeMV infection, occurring either separately or together, suppress the immune system and lead to the development of secondary infections.

It is unclear whether such immunosuppression occurred in the 2007 epizootic of the present study. No pollutant data have been published for animals in this epizootic, though recent work indicates a decline in blubber concentrations of PCBs in Mediterranean bottlenose dolphins from 1978 to 2002 [4]. Nevertheless, it seems likely that if CeMV or PCBs had immunosuppressed the animals in the present study, clinical signs of HV disease would have been observed. The absence of HV lesions in these individuals suggests acute CeMV infection that was strong enough not to permit the development of secondary infections by HV or other pathogens.

The phylogenetic tree constructed from the sequences obtained from the 2007 epizootic, together with previously reported HV sequences, shows that herpesviruses that affect cetaceans can be classified into two groups of α -HV and two groups of γ -HV (Fig. 2). Each group includes HV strains detected from different host species, but at the last branching step, the sequences that group together correspond to a single host species. This clustering is consistent

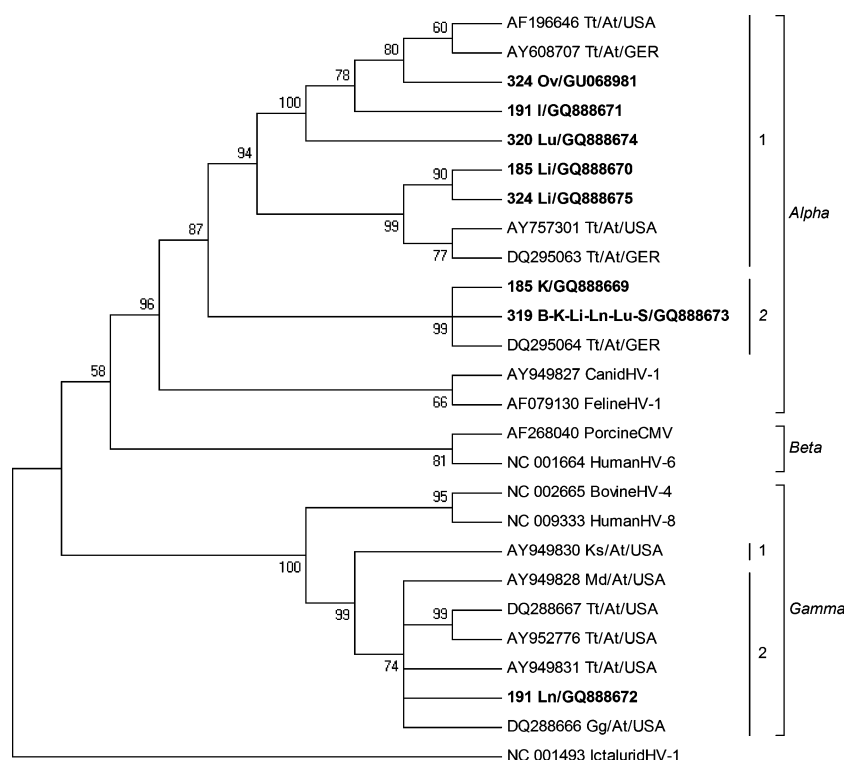


Fig. 2 Neighbor-joining phylogram based on p-distance among putative amino acid sequences of herpesvirus DNA polymerases. The Ictalurid herpesvirus 1 is included as an outgroup member. The bootstrap consensus tree was inferred from 1,000 replicates generated with a random seed (Mega software, version 4.0). The name of each sequence indicates the GenBank accession number of its nucleotide sequence, the name of the virus (HV herpesvirus, CMV cytomegalovirus), and, where applicable, the species of host cetacean (Gg,

Grampus griseus; Ks, *Kogia sima*; Md, *Mesoplodon densirostris*; Tt, *Tursiops truncatus*) and the geographical location (At Atlantic Ocean, GER Germany, USA United States of America). Sequences identified in the present study are in **boldface**; their names indicate the individual reference number, the tissues in which they were detected (B brain, I intestine, K kidney, Li liver, Ln lymph node, Lu lung, Ov ovary, S spleen) and their GenBank accession number

with the possibility that different HV strains have co-evolved with their host [15, 19], based on the fact that herpesviruses tend to be host-specific [18].

Three of the five dolphins (60%) infected with both HV and CeMV contained sequences from more than one HV strain. These are not the first reports of multiple HV infection: three different sequences of α -HV were detected in the skin, spleen and blood of a single bottlenose dolphin stranded on the coast of Germany (GenBank accession numbers AY608707, DQ295063 and DQ295064; Fig. 2) [19].

As these results are the first report of coinfection between CeMV and HV in cetaceans, and the first report of HV in striped dolphins, they should aid in efforts to identify the presence of HV in dolphin populations and to understand the pathogenicity of HV in these animals. Our results suggest that HV may be common among striped dolphins in the Mediterranean, which raises the possibility that HV and CeMV may frequently co-occur. Further studies will be required to determine whether HV is pathogenic in these animals. Moreover, more detailed molecular characterization by the amplification of a region of the

DNA terminase gene [12] and of a larger region of the DNA polymerase gene [19] will be attempted.

Acknowledgments We are grateful to Elena Neves and Verónica Nogal for their excellent technical assistance. This work is dedicated to the memory of Professor Tom Barrett (Institute for Animal Health: Pirbright Laboratory, UK), who kindly provided us with the control DMV MUC strain. This work was partially funded by project CGL2009-08125 of the Spanish National Research Plan and by the Agreement INIA-MARM CC08-020.

Conflict of interest statement The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Aguilar A, Borrell A (1994) Abnormally high polychlorinated biphenyl levels in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) affected by the 1990–1992 Mediterranean epizootic. *Sci Total Environ* 154:237–247
2. Blanchard TW, Santiago NT, Lipscomb TP, Garber RL, McFee WE, Knowles S (2001) Two novel alphaherpesviruses associated with fatal disseminated infections in Atlantic bottlenose dolphins. *J Wildl Dis* 37:297–305

3. Borrell A, Aguilar A, Corsolini S, Focardi S (1996) Evaluation of toxicity and sex-related variation of PCB levels in Mediterranean striped dolphins affected by an epizootic. *Chemosphere* 32:2359–2369
4. Borrell A, Aguilar A (2007) Organochlorine concentrations declined during 1987–2002 in western Mediterranean bottlenose dolphins, a coastal top predator. *Chemosphere* 66:347–352
5. Di Guardo G, Marruchella G, Agrimi U, Kennedy S (2005) Morbillivirus infections in aquatic mammals: a brief overview. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 52:88–93
6. Domingo M, Ferrer L, Pumarola M, Marco A, Plana J, Kennedy S, McAliskey M, Rima BK (1990) Morbillivirus in dolphins. *Nature* 348:21
7. Domingo M, Visa J, Pumarola M, Marco AJ, Ferrer L, Rabanal R, Kennedy S (1992) Pathologic and immunocytochemical studies of morbillivirus infection in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*). *Vet Pathol* 29:1–10
8. Dungworth DL (1993) The respiratory system. In: Jubb JVK, Kennedy PC, Palmer N (eds) *Pathology of domestic animals*, Academic Press, San Diego, pp 539–699
9. Fenner F, Gibbs E, Murphy F, Rott R, Studdert MJ, White D (1993) *Herpesviridae*. *Veterinary virology*. Academic Press Inc, London, pp 301–325
10. Fernandez A, Esperon F, Herraiz P, de Los Monteros AE, Clavel C, Bernabe A, Sanchez-Vizcaino JM, Verborgh P, De Stephanis R, Toledano F, Bayon A (2008) Morbillivirus and pilot whale deaths, Mediterranean Sea. *Emerg Infect Dis* 14:792–794
11. Fournier M, Degas V, Colborn T, Omara FO, Denizeau F, Potworowski EF, Brousseau P (2000) Immunosuppression in mice fed on diets containing beluga whale blubber from the St Lawrence estuary and the Arctic populations. *Toxicol Lett* 112–113:311–317
12. Hargis AM, Ginn PE, Mansell JEKL, Garber RL (1999) Ulcerative facial and nasal dermatitis and stomatitis in cats associated with feline herpesvirus 1. *Vet Dermatol* 10:267–274
13. Heaney J, Barrett T, Cosby SL (2002) Inhibition of in vitro leukocyte proliferation by morbilliviruses. *J Virol* 76:3579–3584
14. Kannan K, Tanabe S, Borrell A, Aguilar A, Focardi S, Tatsukawa R (1993) Isomer-specific analysis and toxic evaluation of polychlorinated biphenyls in striped dolphins affected by an epizootic in the western Mediterranean sea. *Arch Environ Contam Toxicol* 25:227–233
15. McGeoch DJ, Rixon FJ, Davison AJ (2006) Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus Res* 117:90–104
16. Raga JA, Banyard A, Domingo M, Corteyn M, Van Bresse MF, Fernandez M, Aznar FJ, Barrett T (2008) Dolphin morbillivirus epizootic resurgence, Mediterranean Sea. *Emerg Infect Dis* 14:471–473
17. Roizmann B, Desrosiers RC, Fleckenstein B, Lopez C, Minson AC, Studdert MJ (1992) The family *Herpesviridae*: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol* 123:425–449
18. Saliki JT, Cooper EJ, Rotstein DS, Caseltine SL, Pabst DA, McLellan WA, Govett P, Harms C, Smolarek KA, Romero CH (2006) A novel gammaherpesvirus associated with genital lesions in a Blainville's beaked whale (*Mesoplodon densirostris*). *J Wildl Dis* 42:142–148
19. Smolarek Benson KA, Manire CA, Ewing RY, Saliki JT, Townsend FI, Ehlers B, Romero CH (2006) Identification of novel alpha- and gammaherpesviruses from cutaneous and mucosal lesions of dolphins and whales. *J Virol Methods* 136:261–266
20. van Elk CE, van de Bildt MW, de Jong AA, Osterhaus AD, Kuiken T (2009) Herpesvirus in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*): cultivation, epidemiology, and associated pathology. *J Wildl Dis* 45:895–906
21. VanDevanter DR, Warrener P, Bennett L, Schultz ER, Coulter S, Garber RL, Rose TM (1996) Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR. *J Clin Microbiol* 34:1666–1671

IV Infección por herpesvirus con necrosis linfoide grave en un zifio varado en las islas Canarias

Arbelo M, Sierra E, Esperón F, Watanabe TTN, Bellière EN, Espinosa de los Monteros A, Fernández A (2010) Herpesvirus infection with severe lymphoid necrosis affecting a beaked whale stranded in the Canary Islands. *Diseases of Aquatic Organisms*, 89:261-264.

Se describen los hallazgos patológicos en un caso aislado, una hembra adulta de zifio de Cuvier *Ziphius cavirostris* varada en las islas Canarias. El estudio indicó que este zifio se murió con una infección por herpesvirus grave, sistémica, y mostró lesiones diferentes a aquellas causadas por el síndrome embólico de grasa y gas descritas en los zifios varados masivamente asociados con exposición a sonares. Esta es la primera descripción de una infección por alphaherpesvirus del sistema linfático en un zifio.

NOTE

Herpesvirus infection with severe lymphoid necrosis affecting a beaked whale stranded in the Canary Islands

Manuel Arbelo¹, Eva Sierra¹, Fernando Esperón², Tatiane T. N. Watanabe^{1,3},
Edwige N. Bellière², Antonio Espinosa de los Monteros¹, Antonio Fernández^{1,*}

¹Unit of Histology and Veterinary Pathology, Institute for Animal Health, Veterinary School,
University of Las Palmas de Gran Canaria, Canary Islands, Spain

²CISA-INIA, Carretera de Algete a El Casar, 28130 Valdeolmos, Madrid, Spain

³College of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University, Brazil

ABSTRACT: This report describes the pathologic findings in a single, adult female Cuvier's beaked whale *Ziphius cavirostris* stranded in the Canary Islands. The study indicated that this whale died with a severe, systemic, herpesviral infection and clearly exhibited lesions different from those of the fat and gas embolic syndrome described in beaked whale mass strandings associated with sonar exposure. This is the first report of a cetacean alphaherpesvirus infection of the lymphoid system in a beaked whale.

KEY WORDS: Beaked whale · Herpes virus · Lymphoid system

Resale or republication not permitted without written consent of the publisher

INTRODUCTION

To date, 87 beaked whale stranding events were recorded along the coast of the Canary Islands, with a total of 119 individual animals of 6 species stranded: Cuvier's beaked whale *Ziphius cavirostris*, Gervais beaked whale *Mesoplodon europaeus*, Blainville's beaked whale *Mesoplodon densirostris*, True's beaked whale *Mesoplodon mirus*, Sowerby's beaked whale *Mesoplodon bidens* and the northern bottlenose whale *Hyperodon ampullatus*. Of these 119 animals, at least 86 were Cuvier's beaked whales (Martín & Tejedor 2009). This species is sighted regularly at sea, especially off the east coast of Fuerteventura and Lanzarote (V. Martín pers. comm.) and in the waters around El Hierro island (N. Aguilar de Soto pers. comm.).

In the Canary Islands waters, 28 cetacean species have been identified of which 24 species have been found stranded. Etio-pathologically, 62.32% of the cetaceans stranded in the Canary Islands subjected to pathological studies have been diagnosed as natural (i.e. non-anthropogenic) pathological entities that in-

cluded infectious diseases, neonatal pathology, intra- and interspecific interactions and typical mass strandings; and 33.33% of the cases have been diagnosed as anthropogenic entities including fishing interaction (by-catch), atypical mass-stranding linked to naval exercises, ship collisions, and other anthropogenic-related pathology (Arbelo 2007).

There are few reports of herpesviral infections in marine mammals. Most reports are morphological, where the diagnosis is based on gross pathology (Baker 1992), histopathology and immunohistochemistry (Kennedy et al. 1992) or transmission electron microscopy (TEM) (Martineau et al. 1988, Van Bressem et al. 1994). So far, no cetacean herpesviruses have been isolated with cell culture; thus, molecular diagnostic tools are essential to establish their taxonomic classification. Amplification of conserved DNA regions within the herpesvirus polymerase gene (VanDevanter et al. 1996) and terminase gene (Hargis et al. 1999) has been possible using universal PCRs. Further sequencing of the resultant amplicons has provided new reports of alphaherpesvirus in the bottlenose dolphin *Tursiops*

*Corresponding author. Email: afernandez@dmor.ulpgc.es

truncatus (Blanchard et al. 2001, Manire et al. 2006, Smolarek-Benson et al. 2006), and gammaherpesvirus in bottlenose dolphin, Risso's dolphin *Grampus griseus*, dwarf sperm whale *Kogia sima* and Blainville's beaked whale *Mesoplodon densirostris* (Saliki et al. 2006, Smolarek-Benson et al. 2006). Using a universal nested PCR, Esperón et al. (2008) reported the first herpes simplex-like infection found in a stranded dolphin.

MATERIALS AND METHODS

On April 18, 2005, 1 female adult (555 cm long) Cuvier's beaked whale was found dead on the southern coast of Fuerteventura Island (Faro la Entallada). Necropsy was performed approximately 48 to 72 h post-mortem (code 3) (Fernandez 2003, Fernandez et al. 2005).

Necropsy was carried out on the beach following the protocol used previously in other cases of stranded beaked whales (Fernandez et al. 2005). Lung, heart, muscle, thoracic and abdominal lymph nodes, liver, spleen, kidney, stomach, brain and intestines were sampled for routine light microscopic examination. To search for fat emboli, formalin-fixed lung and lymph node samples were post-fixed with osmium and embedded in paraffin following the procedure indicated in Fernandez et al. (2005). Lung, liver, spleen and muscle were sampled for bacteriologic aerobic culture.

For electron-microscopy (EM), formalin-fixed samples from spleen and lymph nodes were processed for routine transmission EM. A universal nested PCR (VanDevanter et al. 1996) that amplifies a conserved region within the polymerase gene of the *Herpesviridae* family was used in spleen, liver, muscle and lung. To detect possible carry over contamination, 2 blank controls (water, PCR-grade) were used for each reaction, one for DNA extraction and another for PCR reaction. A positive control of a herpes simplex-like sequence found in a stranded bottlenose dolphin (Esperón et al. 2008) was also used. The amplicon was directly sequenced by triplicate. Sequenced products were compared with sequences available in Genbank using the Blast search. A neighbor-joining phylogram was made using Mega 4.0 software (see Fig. 5). Sequenced products were compared with sequences available in Genbank using the Blast search.

RESULTS AND DISCUSSION

The stranded whale exhibited a relatively good body condition. The main external findings consisted of post-mortem shark bites in the melon and in the dorsal and ventral abdominal regions. The stomach contained little

ingesta indicating the animal had been anorectic for some time prior to death. The thorax was filled with a dark red fluid without blood clots. The lungs, trachea, and primary bronchi were congested and contained frothy fluid. The pulmonary lymph nodes were enlarged, and the spleen was smaller than normal for this species. Small, white to gray necrotic foci were observed in sections of the spleen. The liver was autolytic and congested. The kidneys were congested, and numerous adult parasites (*Crassicauda* spp.) were found within the ureters. *Cetobacterium ceti* and *Clostridium sordelli* spp. (both non-pathogenic bacteria) grew from routine aerobic bacterial cultures of brain, lung and spleen.

Microscopically, small, superficial dermal vessels were congested. Lung parenchyma was diffusely congested with areas of alveolar edema and atelectasia. No cardiac lesions were observed. The lymph nodes and spleen had severe, diffuse, coagulative necrosis and fibrinonecrotic vasculitis with prominent thrombi (Figs. 1 & 2). A large number of monocytic cells in spleen and lymph nodes had intranuclear inclusion bodies consistent with those of herpesviral or adenoviral infection (Fig. 3). The kidneys showed a chronic, parasitic, granulomatous nephritis, and in the liver, hepatocytes were atrophic and contained grey/brown, intracytoplasmatic lipofuscin pigment. Small fibrin thrombi were observed in the hepatic sinusoids. Submucosal and serosal vessels of the stomach were congested. Of the 4 samples processed, no fat emboli were seen. Although tissues were moderately autolytic, no lesions of gas embolism were observed. The histopathologic diagnosis was a systemic, widespread, necrotizing lymphadenitis and splenitis with acute necrotizing vasculitis and thrombosis.

Ultrastructurally, many, non-encapsulated, 100 nm herpes virions were observed in nuclei of monocytes

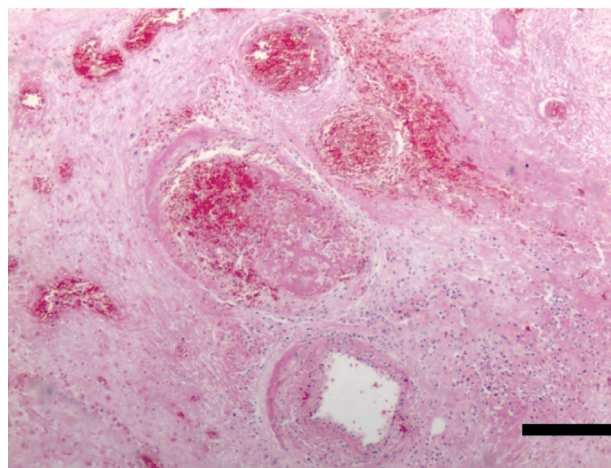


Fig. 1. *Ziphius cavirostris*. Pulmonary lymph node. Vessels have vasculitis associated with congestion and thrombosis. Hematoxylin & eosin. Scale bar = 200 μ m

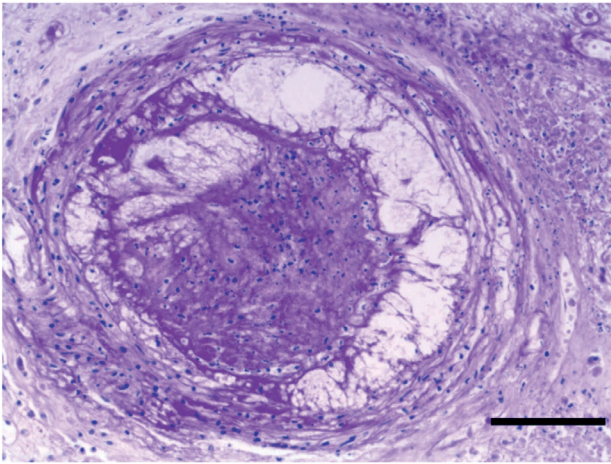


Fig. 2. *Ziphius cavirostris*. Mesenteric lymph node. Necrotizing vasculitis with a thrombus occluding the lumen. Periodic acid-Schiff stain. Scale bar = 100 µm

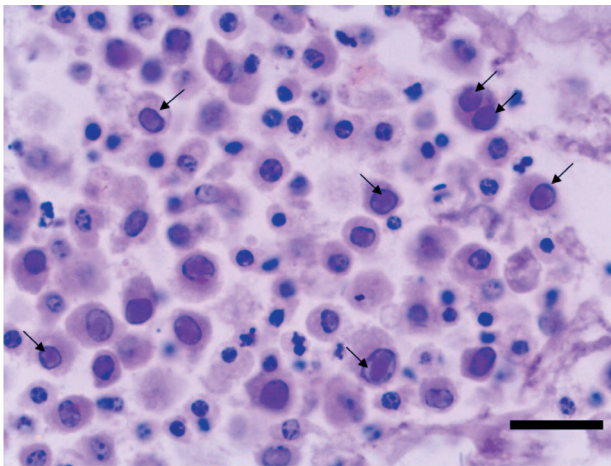


Fig. 3. *Ziphius cavirostris*. Mesenteric lymph node. Monocytes contain intranuclear inclusion bodies (arrows). Periodic acid-Schiff stain. Scale bar = 20 µm

from spleen and one abdominal lymph node (Fig. 4) and PCR testing detected *Herpesvirus*-specific bands in lung and spleen. Results of PCR showed a 198 bp band. Sequencing and further comparison with GenBank records showed a novel sequence highly related to cetacean alpha herpesvirus. The homology to their closest sequences in the Genbank (AF196646 and AY949832) was 84.2%. The sequence of the isolate obtained in this study was classified within the cetacean alphaherpesviruses group, and submitted to GenBank (Accession Number GU066291) (Fig. 5). It was concluded that this beaked whale had a severe, systemic herpesviral infection manifested most prominently in the lymphoid system.

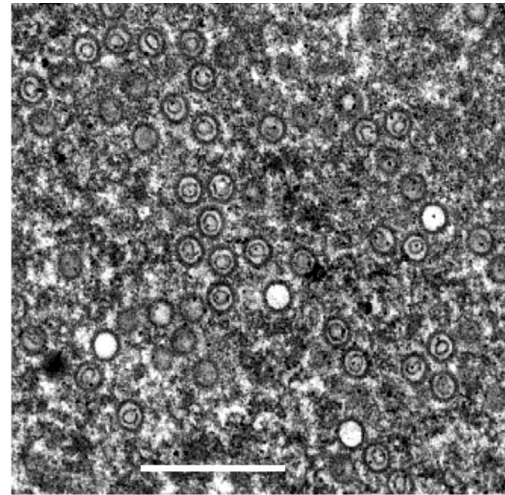


Fig. 4. *Ziphius cavirostris*. Many virions are observed intranuclearly in the monocytes of the mesenteric lymph node by electron microscopy. Scale bar = 500 nm

Very few data are available about herpesviral systemic infections in cetaceans; one case of encephalitis in a harbour porpoise has been reported (Kennedy et al. 1992). Unfortunately, no brain was tested in the present study. In addition, 2 cases of generalized systemic herpesviral infections in bottlenose dolphins (Blanchard et al. 2001) have been described, and 2 novel sequences from herpesviral polymerase genes were detected. Main pathological findings were observed in the lymphoid system, heart, skin and adrenal glands. These sequences showed a close homology with those described in other bottlenose dolphins with skin diseases (Smolarek-Benson et al. 2006) and therefore they may be considered as the same viral species. In the present study, the PCR results showed a novel sequence classified within the cetacean alphaherpesviruses group.

Few cases involving stranded beaked whales have been published with detailed pathologic findings. This case report documents an infectious disease affecting these poorly known whale species, and records the first case of an alphaherpesvirus affecting the lymphoid system in beaked whales. The virus showed a marked tropism towards the lymphoid system, infecting mainly monocytes which would be the key cell in the pathogenesis of the necrosis observed in the lymph nodes and spleen, as well as the acute necrotizing vasculitis and thrombosis, despite the fact that no herpesviral inclusion bodies or virions were observed in vascular endothelial cells, either histologically or ultrastructurally.

This is the first report of a cetacean alphaherpesvirus infection causing a severe lymphoid necrosis in a stranded beaked whale (*Ziphius cavirostris*).

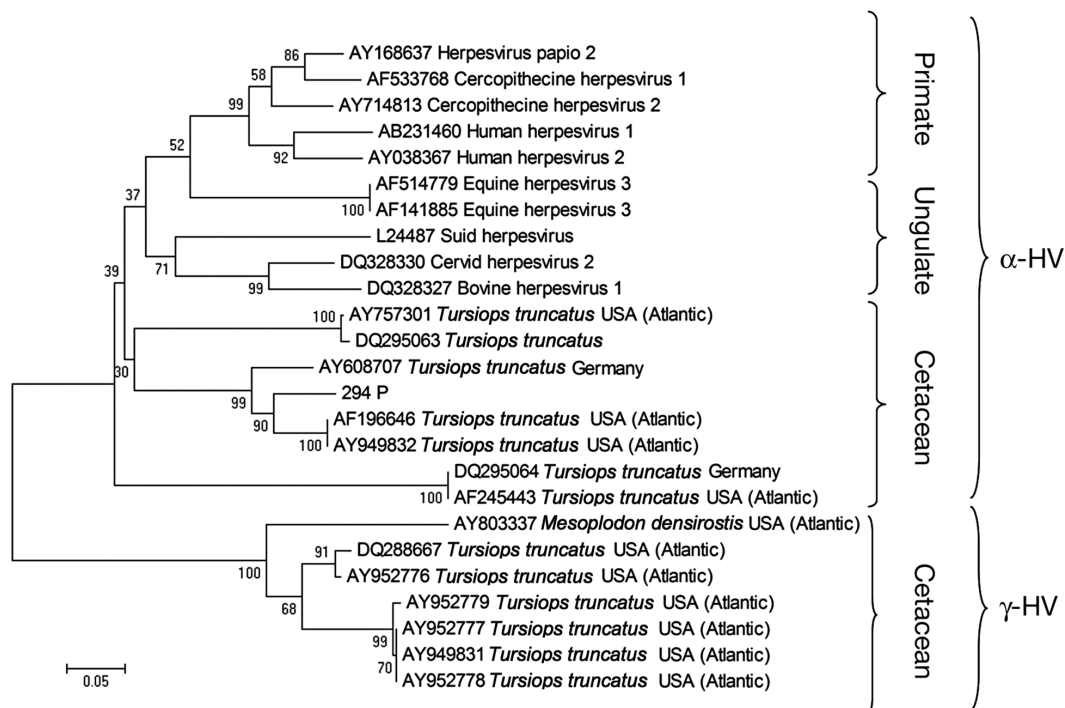


Fig. 5. Neighbor-joining phylogram of 25 selected sequences from cetacean alpha- and gammaherpesvirus (HV) and other phylogenetically related alphaherpesviruses. Either the virus name or the host species is given alongside each GenBank Accession Number. The isolate from the present study (294P, GenBank Accession Number GU066291) showed greatest homology (84.2%) with Genbank sequences AF196646 and AY949832

Acknowledgements. We thank the Dirección General del Medio Natural del Gobierno de Canarias, Ministerio de Ciencia e Innovación (Project CGL 2009/12663), Ministerio de Medio Ambiente, Rural y Marino and Agencia Canaria de Investigación (C200801000288) for financial support of the present work. We thank Prof. J. Edwards for corrections and comments and B. Muñoz for technical assistance.

LITERATURE CITED

- Arbelo M (2007) Pathology and causes of deaths of stranded cetaceans in the Canary Islands (1999–2005). PhD thesis, University of Las Palmas de Gran Canaria (in Spanish with English abstract)
- Baker JR (1992) Skin disease in wild cetaceans from British waters. *Aquat Mamm* 18:27–32
- Blanchard TW, Santiago NT, Lipscomb TP, Garber RL, McFee WE, Knowles S (2001) Two novel alphaherpesviruses associated with fatal disseminated infections in Atlantic bottlenose dolphins. *J Wildl Dis* 37:297–305
- Esperón F, Fernández A, Sánchez-Vizcaino JM (2008) Herpes simplex-like infection in a bottlenose dolphin stranded in the Canary Islands. *Dis Aquat Org* 81:73–76
- Fernández A (2003) Pathology of beaked whales mass stranded during the naval military maneuvers near the Canary Islands. *Proc Workshop Active Sonar and Cetaceans*. Eur Cetacean Soc Newsl 42: 37–40
- Fernández A, Edwards JF, Rodríguez F, Espinosa A and others (2005) Gas and fat embolic syndrome involving a mass stranding of beaked whales (family *Ziphiidae*) exposed to anthropogenic sonar signals. *Vet Pathol* 42:446–457
- Hargis AM, Ginn PEJ, Mansell EKL, Garber RL (1999) Ulcerative facial and nasal dermatitis and stomatitis in cats associated with feline herpesvirus 1. *Vet Dermatol* 10: 267–274
- Kennedy S, Lindstedt IJ, McAliskey MM, McConnell SA, McCullough SJ (1992) Herpesviral encephalitis in a harbor porpoise (*Phocoena phocoena*). *J Zoo Wildl Med* 23: 374–379
- Manire CA, Smolarek KA, Romero CH, Kinsel MJ, Clauss TM, Byrd L (2006) Proliferative dermatitis associated with a novel alphaherpesvirus in an Atlantic bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *J Zoo Wildl Med* 37:174–181
- Martín V, Tejedor M (2009) Summary results of 20 years of beaked whale strandings in the Canary Islands. *Eur Cetacean Soc Spec Publ* 51:26–28
- Martineau D, Lagacé A, Béland P, Higgins R, Armstrong D, Shugart LR (1988) Pathology of stranded beluga whales (*Delphinapterus leucas*) from the St. Lawrence Estuary, Québec. Canada. *J Comp Pathol* 98:287–311
- Saliki JT, Cooper EJ, Rotstein DS, Caseltine SL and others (2006) A novel gammaherpesvirus associated with genital lesions in a Blainville's beaked whale (*Mesoplodon densirostris*). *J Wildl Dis* 42:142–148
- Smolarek-Benson KA, Manire CA, Ewing RY, Saliki JT, Townsend FI, Ehlers B, Romero CH (2006) Identification of novel alpha- and gammaherpesviruses from cutaneous and mucosal lesions of dolphins and whales. *J Virol Methods* 136:261–266
- Van Bresse MF, Van Waerebeek K, Garcia-Godos A, Dekegel D, Pastoret PP (1994) Herpes-like virus in husky dolphins, *Lagenorhynchus obscurus*, from coastal Peru. *Mar Mamm Sci* 10:354–359
- VanDevanter DR, Warrenner P, Bennett L, Schultz ER, Coulter S, Garber RL, Rose TM (1996) Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus PCR. *J Clin Microbiol* 34:1666–1671

DISCUSIÓN



Globicephala melas. Mónica Pérez y Vidal Martín - Sociedad para el Estudio de los Cetáceos en el Archipiélago Canario - Lanzarote - Islas Canarias

A continuación se discutirán los resultados más destacados de los artículos de la presente tesis. Se pondrá especial énfasis en aquéllos datos que resulten más relevantes tanto en la epidemiología como en la nomenclatura de los morbillivirus y herpesvirus de cetáceos.

Para facilitar la lectura de los mismos, se ha dividido la discusión en cinco apartados:

- I. Papel de los calderones en la transmisión de CeMV.
- II. Origen y evolución del DMV responsable del brote del Mediterráneo en 2006-2008.
- III. Papel de los HV de cetáceos en delfines listados del Mediterráneo como patógenos secundarios a CeMV.
- IV. Papel de un HV de cetáceo como patógeno primario en un *Z. cavirostris*.
- V. Discusión sobre nuevas nomenclaturas propuestas para facilitar la denominación de las diferentes secuencias tanto de CeMV como de HV

I Papel de los calderones en la transmisión de CeMV

Los resultados obtenidos en esta Tesis demuestran la presencia de PWMV-like en *Globicephala macrorhynchus* (calderón tropical) en el Océano Atlántico (Artículo 1, 2011). Junto con la previa descripción de PWMV en un *G. melas* también en el Atlántico (Taubenberger et al. 2000), estos datos aportan una valiosa información sobre el posible papel de las especies de calderón en la difusión del CeMV.

De hecho, en los únicos dos estudios moleculares disponibles hasta la fecha sobre la presencia de CeMV en calderones del océano Atlántico, se detectaron solamente PWMV (Taubenberger et al., 2000) y PWMV-like (Artículo 1, 2011), y no DMV ni PMV.

Debido a la existencia de reacciones serológicas cruzadas entre las diferentes especies de morbillivirus (Duignan et al., 1995; Van Bresse et al., 2001), se propone la hipótesis de que los CeMV que infectan los *Globicephala* sp. del Atlántico fuesen PWMV y PWMV-like y no otros CeMV.

Por tanto, a diferencia de lo que se ha considerado previamente (Duignan et al., 1995; Van Bressem et al., 2009), los calderones no deberían considerarse ni portadores ni transmisores de PMV o de DMV a otras regiones geográficas y a otros odontocetos, donde las epizootias se produjeron por estos virus. Y DMV, responsable del varamiento de al menos 60 *G. melas* en el brote de las costas españolas de 2006-2008 (Fernández et al. 2008, De Stephanis et al. 2009), debe considerarse altamente virulento para *G. melas*.

La ausencia de evidencia de varamientos masivos causados por PWMV y PWMV-like podría avalar una mayor adaptación a sus hospedadores, los *Globicephala* sp. Además, de los tres casos descritos de enfermedad por CeMV en el Atlántico, se han descrito dos casos, un *G. melas* varado en 1989 (Duignan et al. 1995b) y un *G. machrorhynchus* varado en 1996 (Artículo 1, 2011) que fueron animales jóvenes, y un tercero, un *G. melas*, del cual no se especifica la edad (Taubenberger et al. 2000), lo que podría reforzar la hipótesis de que la enfermedad afectaría más a individuos jóvenes con menos protección inmune.

Por lo tanto, sería fundamental el diagnóstico molecular sistemático en calderones tanto con lesiones compatibles con IM, como sin ellas, muy especialmente en el Atlántico, seguido de la caracterización molecular de las cepas de CeMV halladas. La realización de estos análisis permitiría comprender con mayor exactitud el papel que juegan los calderones en la epidemiología del CeMV.

II Origen y evolución del DMV responsable del brote del Mediterráneo en 2006-2008

El brote de DMV del Mediterráneo occidental durante 2006-2008 se produjo 14 años después del final del primer y único brote registrado en esta localización. Cuando se compararon las secuencias halladas en el gen de la fosfoproteína (P) de diferentes especies de cetáceos (*G. melas*, *T. truncatus* y *S. coeruleoalba*) (Fernández et al. 2008, Keck et al. 2010), y el gen de la nucleoproteína (N) en *S. coeruleoalba* (Raga et al. 2008) varados en 2007, con las de *S. coeruleoalba* varados en 1990, se descubrió que eran casi idénticas.

Con el fin de establecer el posible origen del virus de 2006-2008 (Artículo 2, Figura 1), por un lado, las secuencias correspondientes a una pequeña parte del genoma (729 pb, genes parciales N, P y F) obtenidas de todos los animales disponibles varados en el brote, se compararon con secuencias procedentes de distintas áreas geográficas y otros años (Artículo 2, 2011). Por otro lado, se ha realizado por primera vez una comparación de un gran porcentaje del genoma (cinco de las seis proteínas estructurales; 9050 pb) entre tres secuencias distintas de DMV: las dos obtenidas de *G. melas* y *S. coeruleoalba* de 2007, y la previamente publicada de la cepa DMV_Sc/1990. Este es, el primer estudio sobre evolución entre brotes del DMV (Artículo 2, Figura 1).

El brote de DMV del Mediterráneo empezó en 2006 en el estrecho de Gibraltar, y los *G. melas* se encontraron varados a ambos lados de éste, en el lado Atlántico y en el Mediterráneo (De Stephanis et al., 2009; Fernández et al., 2008). Además, previamente a la publicación del artículo 1 de la presente tesis, se había emitido la hipótesis de que los *G. melas* del Atlántico podían ser reservorios de DMV y/o PMV para otras especies de cetáceos (Duignan et al., 1995). De ahí que era razonable sospechar que el brote tuviese un origen atlántico (Raga et al., 2008). Más tarde, en enero 2007, varó en el mar del Norte un *Lagenorhynchus albirostris* afectado por DMV (Wohlsein et al., 2007). Si DMV estaba circulando en el mar del Norte, es posible que individuos infectados de esta región, posiblemente *G. melas*, propagasen el virus a los *S. coeruleoalba* del Mediterráneo (Van Bresse et al., 2009).

Sin embargo, tres observaciones parecen entrar en conflicto con ésta hipótesis:

- En primer lugar, el análisis filogenético del artículo 2 sobre fragmentos cortos indica que DMV_Sc/1990 podría haber originado DMV_Gme/2007 y DMV_Sc/2007, mientras que la secuencia hallada en el *L. albirostris* pertenece a un clado diferente (artículo 2, figura 1, panel superior).
- Segundo, la epidemia en el Mar Mediterráneo en 2006-2008 produce la muerte de al menos 60 *G. melas* (De Stephanis et al., 2009; Fernández et al., 2008) y 200 *S. coeruleoalba* (Keck et al., 2010; Raga et al., 2008). En contraste, sólo un *L. albirostris* se vió afectado en el mar del Norte.

- Tercero, DMV podría ser emergente para *G. melas*, ya que estudios moleculares en calderones del Atlántico, antes de 2006, mostraron evidencia solamente de las cepas PWMV (Taubenberger et al., 2000) y PWMV-like (Artículo 1, ver punto I de la discusión).

Estos tres puntos parecen descartar que exista relación entre el caso de IM en el *L. albirostris* en 2007, y el brote del Mediterráneo de 2006-2008. Además, en el brote de 2006-2008, varan *G. melas* de todas las edades, siendo la mayoría adultos; hecho que sugiere que no existe una inmunidad previa en la población, y por tanto, que DMV se puede considerar emergente en *G. melas* del Mediterráneo (Fernández et al., 2008). En contraste, los *S. coeruleoalba* afectados durante este brote, fueron principalmente juveniles, debido posiblemente a que los adultos presentaban inmunidad residual del brote de 1990-1992 (Raga et al. 2008).

La hipótesis más plausible para entender las relaciones filogenéticas entre las tres cepas de DMV del Mediterráneo, sería la existencia de un virus DMV mediterráneo anterior al brote, que hubiese evolucionado a partir del DMV_Sc/1990, y que difiriese de éste en 55 sustituciones. Dicha cepa podía haber evolucionado y divergido dentro de los *S. coeruleoalba* antes de la epidemia de 2006, dando lugar a DMV_Gme/2007 y DMV_Sc/2007, que son 99,9% idénticos entre sí (Artículo 2, Figura 2).

En definitiva, es altamente probable que el DMV hallado en el brote de 2006-2008 provenga del virus del brote de 1990-1992, por lo que se debería considerar, con los datos moleculares disponibles hasta la fecha, que el brote de 2006-2008 tiene su origen en el mar Mediterráneo.

III Papel de los HV de cetáceos en delfines listados del mediterráneo como patógenos secundarios a CeMV

En el artículo 3 que se presenta en esta Tesis, se describe por primera vez la coinfección CeMV-HV en cetáceos, además de proporcionar las primeras secuencias de HV en *S. coeruleoalba*, y las primeras de un cetáceo del Mediterráneo.

Previamente, la coinfección morbillivirus – HV en especies de mamíferos marinos tan sólo se ha descrito en una ocasión. Se trata de una especie de pinnípedo: una *Phoca vitulina* enferma por PDV, y en la cual se aisló un HV. El animal varó durante la epizootia de PDV de 1988 en el mar del Norte donde murieron unas 18000 *P. vitulina*. Como consecuencia, no parece que la infección por HV constituyera un factor relevante en la epizootia de PDV de 1988 (Domingo et al. 1992), al igual que en la epizootia de CeMV de 2007.

Con el objetivo de aportar datos referentes a las causas desencadenantes de coinfección CeMV-HV en *S. coerulealba* en el mar Mediterráneo en 2007, se tienen en cuenta posibles factores de inmunosupresión. El primer factor a considerar es CeMV ya que se ha demostrado que, *in vitro*, produce inmunosupresión por inhibición de la linfoproliferación (Heaney et al. 2002). Durante la epizootia de *S. coerulealba* en 1990, agentes patógenos como *Aspergillus fumigatus* y *Toxoplasma gondii* se identificaron como patógenos secundarios, cuya infección se atribuyó a los efectos inmunodepresivos de CeMV (Domingo et al. 1992).

Sin embargo, además del papel inmunosupresor de CeMV, en los animales de la epizootia de 1990 se detectaron niveles anormalmente altos de PCBs (bifenilos policlorinados) (Aguilar & Borrell 1994), que pueden inducir por sí mismos inmunosupresión (Borrell et al. 1996, Fournier et al. 2000). Estas altas concentraciones de PCBs pueden haber contribuido a la propagación y gravedad de la epizootia de 1990 (Kannan et al. 1993). Por tanto, es probable que en la epizootia de 1990, tanto los altos niveles de PCB como la infección por CeMV, hayan intervenido en la depresión del sistema inmune y hayan permitido el desarrollo de infecciones secundarias.

Posteriormente a la epizootia de 1990, en las costas mediterráneas occidentales, en un estudio realizado entre 1978 y 2002, se ha descrito un declive en las concentraciones de DDTs (Dicloro Difenil Tricloroetano) y PCBs en *S. coerulealba* (Aguilar & Borrell 2005). Y en la epizootia de 2006-2008, no existen evidencias de que las concentraciones halladas de compuestos organoclorados hayan podido desencadenar inmunosupresión en los *S. coerulealba* (Castrillon et al. 2010).

De allí que CeMV, mediante su poder inmunosupresor, haya podido favorecer infecciones por HV, o la reactivación de HV latentes de los propios individuos (Fenner et al. 1993, Blanchard et al. 2001).

Posteriormente, otro estudio pone de manifiesto que, de cinco *S. coeruleoalba* varados durante la epizootia de 2006-2008 en las costas catalanas que fueron positivos a CeMV por IHQ, uno (1/5), presentaba coinfección CeMV-HV (Soto et al. 2011b). Uniendo ambos datos, éstos (Soto et al. 2011b) y los obtenidos en el artículo 3 de esta Tesis, se observa que un 46 % (6/13) de los individuos analizados para la detección de CeMV y HV son positivos a ambos virus (Artículo 3, 2010, Soto et al. 2011b). La diferencia entre el porcentaje hallado en el artículo 3 (62,5%, 5/8), y en el artículo de Soto et al. (2011b) (20%, 1/5) puede ser debida a las técnicas de diagnóstico utilizadas. En efecto, se hizo un rastreo molecular para la detección de CeMV y HV, mientras que Soto et al. (2011b) utilizan la IHQ para el rastreo de CeMV y HV.

Por otro lado, se han hallado otros agentes infecciosos como *Toxoplasma gondii* y *Aspergillus-like* en un 80 % (4/5) de los individuos infectados por CeMV durante la epizootia de 2006-2008 (Soto et al. 2011b). Estos agentes se han descrito durante las dos epizootias de CeMV del mar Mediterráneo (1990-1992 y 2006-2008) pero no en el periodo interepizootico, lo que refleja el papel inmunosupresor de CeMV en la aparición de infecciones secundarias (Soto et al. 2011b).

Por tanto, la detección de diferentes secuencias de HV correspondientes a putativos diferentes HV, así como de otros agentes como *Toxoplasma gondii* y *Aspergillus-like* indica con gran probabilidad que son patógenos secundarios a CeMV, virus que ha producido lesiones en todos los individuos considerados en esta discusión (13 *S. coeruleoalba*) (Artículo 3, 2010, Soto et al. 2011b).

En conclusión, se ha puesto de manifiesto que en la epizootia de CeMV de 2006-2008, es frecuente la coinfección CeMV-HV en *S. coeruleoalba* del Mediterráneo (46%; N=13). Además, las nuevas secuencias de HV halladas podrían corresponderse con nuevos HV cuya infección parece secundaria a CeMV.

IV Papel de un HV de cetáceo como patógeno primario en un *Z. cavirostris*

Las infecciones sistémicas por HV de cetáceos se han descrito en un número reducido de casos. Se han hallado en dos *T. truncatus* varados en la costa atlántica de EEUU en 1995 y 1999 (Blanchard et al. 2001).

En esta Tesis, en el artículo 4, se presenta otro caso, un *Z. cavirostris* varado en Tenerife en 2005, describiendo por primera vez una infección sistémica por HV en una nueva especie (*Z. cavirostris*) y en una nueva área geográfica (archipiélago canario). En este individuo, la misma secuencia se ha detectado en bazo y pulmón (nº de acceso al GenBank GU066291) (Artículo 4, 2010), y una secuencia altamente similar se ha hallado en la muestra de ovario del individuo 324 que llamaremos “ID 324 ovario” (nº de acceso al GenBank GU068981) (Artículo 3, 2010) siendo la similitud entre ambas dos últimas secuencias nucleotídicas y aminoacidicas del 99,5%, y del 100% respectivamente (dato no publicado).

La alta similitud indica con alta probabilidad que estas dos secuencias podrían pertenecer a un mismo virus. En este sentido, aunque la secuencia del HV hallada en el ID 324 ovario no se pudo asociar con enfermedad, sí se ha podido demostrar enfermedad en un *Z. cavirostris*.

Además, se ha descrito el caso de un *S. coeruleoalba* varado en Gerona que presentó lesiones compatibles con CeMV y HV. La secuencia de HV hallada en pulmón y linfonódulo pulmonar (nº de acceso al GenBank HQ214675) era 99 % idéntica a la hallada en el *Z. cavirostris*, y 98 % idéntica a la del ovario del *S. coeruleoalba* ID 324 (Soto et al. 2011a).

Estas altas similitudes entre las tres secuencias (98 - 99,5 %) son un hallazgo relevante debido a que parecen indicar que el mismo virus, o cepas del mismo virus, o incluso diferentes virus que son similares sólo en el gen de la ADN polimerasa, estaban circulando en dos especies de cetáceos (*Z. cavirostris* y *S. coeruleoalba*) y en dos áreas geográficas diferentes, pero próximas: el archipiélago canario y el mar Mediterráneo occidental (aproximadamente 1100 Km de distancia).

Por tanto, hasta la fecha, las tres secuencias (nº de acceso al GenBank GU066291, GU068981 y HQ214675) de este posible único virus se han hallado:

(1) al menos dos veces en dos *S. coeruleoalba* diferentes, frente a una vez en un *Z. cavirostris*, y

(2) en los dos *S. coeruleoalba*, la infección por HV parece secundaria a la infección por CeMV mientras que en el *Z. cavirostris* el HV ha sido identificado como el agente primario causante de la muerte.

Ambos datos parecen indicar que es más probable que el hospedador habitual fuese el *S. coeruleoalba* (virus más adaptado a su hospedador) y el hospedador ocasional, el *Z. cavirostris*.

Sin embargo, es muy importante subrayar que estas observaciones están sesgadas por el insuficiente número de secuencias disponibles de HV de cetáceos. Se requieren más estudios para determinar si las cepas de HV de cetáceo son especie-específicas, su especie hospedadora, si son más virulentas, y en qué circunstancias pueden producir infecciones productivas.

V Nuevas nomenclaturas propuestas para facilitar la denominación de las diferentes secuencias tanto de CeMV como de HV

Una de las principales metas de la clasificación es proporcionar un esquema en el cual los nuevos virus puedan ser identificados. Los caracteres que pueden ser útiles en la discriminación de una especie de virus entre un género u otro, según Van Regenmortel et al. (1997), son:

1. Relación entre las secuencias genómicas.
2. Rango de hospedador natural.
3. Tropismo celular y tisular.
4. Patogenicidad y citopatología.
5. Modo de transmisión.
6. Propiedades físico-químicas.
7. Propiedades antigénicas.

Hoy en día, cada vez más se recurre a la secuenciación parcial del genoma, y está demostrado que es un complemento poderoso a los métodos serológicos en la discriminación de especies virales. El problema es que en la mayoría de los casos no existen suficientes datos para la asignación de una especie viral. Sin embargo, debido a la plusvalía que la designación de especies proporciona, la escasez de datos no debe ser un impedimento en hacer asignaciones de especies y clasificaciones tentativas cuando los datos son incompletos (Van Regenmortel et al. 1997).

En este sentido, tanto para CeMV como para los HV de cetáceos, de los siete factores anteriormente citados, solamente se han publicado datos acerca de los cuatro primeros: relación entre las secuencias genómicas, rango de hospedador natural, tropismo celular y tisular, y patogenicidad y citopatología.

V.1 CeMV

Hoy en día no se ha desarrollado ningún estudio sistemático de la presencia de CeMV empleando técnicas moleculares en un rango amplio de mamíferos marinos. Por ende, la información disponible es limitada y se dificulta la clasificación de este virus.

V.1.1 “Grupos” en vez de “cepas”

El ICTV (Comité Internacional de Taxonomía Vírica) es el único organismo que tiene la potestad en la taxonomía de los virus. El término “cepa” se corresponde con las secuencias halladas de cada virus. Hasta la fecha, como se ha podido apreciar en los Artículos 1 y 2, existen al menos dos cepas de PWMV, varias cepas de DMV, y varias de PMV. Por lo que la utilización del término “cepa” o “strain” para designar cada uno de los tres CeMV es cuestionable.

Al igual que lo hacen Van Bresse et al. (2009), parece más adecuado considerar PMV, DMV y PWMV como “tres grupos de cepas” de un mismo virus. En este sentido, en el Artículo 2 se ha optado por el término “grupo” en vez del tradicionalmente usado término “cepa” para designar PMV, DMV y PWMV.

En este estudio (Artículo 1, 2011), a pesar de los escasos datos de secuencias de CeMV descritos, los resultados apoyan la hipótesis de la existencia de al menos tres grupos diferenciados de cepas de CeMV (Van Bresse et al. 2009a).

V.1.2 Regiones más significativas del genoma de CeMV

La RT-PCR del gen P (Barrett et al. 1993) amplifica una región que permite una clasificación filogenética adecuada. En efecto, en base al gen P, los morbillivirus de cetáceos (PMV, DMV y PWMV) son más cercanos filogenéticamente a los morbillivirus de ruminantes (RPV y PPRV) que a los de carnívoros (PDV y CDV) (Artículo 1, Figura 1) (Barrett et al. 1993, Visser et al. 1993, Blixenkrone-Moller et al. 1994, Blixenkrone-Moller et al. 1996, Haffar et al. 1999, Taubenberger et al. 2000). Además, al ser una RT-PCR universal para morbillivirus, ha sido la más utilizada en la caracterización molecular de CeMV. Y al estar disponibles en un mayor número las secuencias de los diferentes CeMV correspondientes a esta zona, sigue siendo la región de elección para clasificar filogenéticamente un CeMV nuevo. En este sentido, esta región del gen P se ha utilizado en el Artículo 2 para ubicar si las cepas de DMV de 2007 eran más próximas filogenéticamente a DMV de 1990 (Artículo 2, Figura 1, panel superior).

Las RT-PCRs del gen N utilizadas por Taubenberger et al. (1996) (posición en el genoma 849-1078) y Raga et al. (2008) (posición en el genoma 869-1057), se corresponden con el árbol N1 (Artículo 1, Figura 1), y es una región frecuentemente amplificada.

Como se puede observar, la información obtenida es suficiente para determinar que las secuencias N1 y P de PWMV-like (Artículo 1, Figura 1) mostraban una mayor relación con PWMV que con DMV o PMV.

En el caso del árbol F (Artículo 1, Figura 2, árbol F), al igual que en el árbol N1, no se clasificaron adecuadamente las diferentes especies de morbillivirus debido a que las secuencias de CeMV se clasificaron más próximas al clado formado por los morbillivirus de carnívoros (CDV y PDV) que al clado formado por PPRV, RPV y MeV.

Sin embargo, el análisis filogenético de las secuencias de PWMV-like correspondientes a las regiones N1 y F, ha permitido demostrar que PWMV-like se ajustaba en un nuevo grupo dentro de CeMV. Por lo que la información obtenida a partir de estas dos regiones también tiene peso.

V.1.3 Regiones más significativas de los morbillivirus

La necesidad de amplificar las regiones más informativas del genoma reside en permitir una clasificación filogenética más robusta de las secuencias amplificadas, y, por analogía, del virus detectado.

En la discusión del Artículo 2 se describen las características moleculares de cada gen de las proteínas estructurales. Las regiones del genoma que presentan mayor grado de información para obtener una correcta clasificación filogenética entre las diferentes especies de morbillivirus, son el extremo C-terminal del gen N y el gen H. Son dos regiones requeridas por la OMS (Organización Mundial de la Salud) para la clasificación de las diferentes cepas del virus del sarampión (WHO 2001).

En el gen N (532 aa), se han descrito cuatro zonas (Banyard et al. 2008). La región I (aa 1-121) está bastante conservada, la II (aa 122-145) lo está menos, la III (aa 146-398) está altamente conservada, siendo del 85 % el grado de similitud entre los diferentes morbillivirus y finalmente la IV, que se corresponde con el extremo hipervariable C-terminal (aa 399- 523) (Blixenkrone-Moller et al. 1994, Bolt et al. 1994, Diallo et al. 1994, Banyard et al. 2011).

La obtención de secuencias correspondientes al extremo hipervariable C-terminal, como demostrado en el Artículo 1 (Figura 2, árbol N2) permite un estudio filogenético adecuado, debido a que los CeMV se clasifican más próximamente a MeV, PPRV y RPV que a los virus de carnívoros (PDV y CDV).

CeMV está ampliamente considerado como un único virus (Van Bresse et al. 2009a); sin embargo, otros autores discrepan sobre la clasificación de PMV y DMV como dos grupos de cepas de un único virus (van de Bildt et al. 2005, Banyard et al. 2011).

Para averiguarlo, Van de Bildt et al. (2005) se apoyaron en estudios filogenéticos de los fragmentos del genoma de PMV y DMV correspondientes a 471 nts (posición en el genoma nts 1222 – 1695) (van de Bildt et al. 2005) que engloban los 354 nts (posición en el genoma nts 1325-1679) que codifican para el extremo C-terminal del gen N (aa 399-518) (Blixenkrone-Moller et al. 1994, Bolt et al. 1994). También amplificaron el gen H completo.

En el Artículo 1, de estas dos zonas, una vez eliminadas las regiones correspondientes de los cebadores, se compararon 144 pb de la zona C-terminal hipervariable del gen N y 317 pb del gen H. En su estudio, van de Bildt et al. (2005), con el fin de valorar si PMV y DMV se debían o no considerar virus de la misma especie viral CeMV, compararon respectivamente 456 pb y 1777 pb de estas mismas zonas.

Aunque las regiones amplificadas en el Artículo 1 no abarcaron toda la longitud de las dos regiones de interés, se considera que la longitud amplificada fue suficiente, debido a que los árboles edificadas en base a estas secuencias clasificaron adecuadamente las especies de morbillivirus (Artículo 1, Figura 2, árboles N2 y H). Estos datos apoyarían la hipótesis de que existen tres grupos de CeMV divergentes entre ellos: PMV, DMV y PWMV-like.

Adicionalmente, los análisis filogenéticos publicados en el primer trabajo de PWMV (Taubenberger et al. 2000) ponen de manifiesto que esta cepa está situada más cerca del ancestro común de los morbillivirus de cetáceos, por lo que los autores sugieren que se trata de una cepa más antigua dentro de los CeMV y mejor adaptada a su hospedador. En el artículo 1, sin embargo, una vez incluida la cepa PWMV-like en los árboles filogenéticos, sólo se verificó esta observación en el árbol N2 (Artículo 1, Figura 2), hallazgo importante ya que el extremo C-terminal de la proteína N es una de las dos regiones más informativas del genoma.

En el artículo 2, se ha destacado otra región de interés: la secuencia no traducida (UTR) del extremo 5' del gen F, que es un fragmento largo (423 pb) comprendido entre el nt. 4856 y el 5276, y que parece ser específico de la especie viral en el grupo de los morbillivirus (Meyer & Diallo 1995).

La similitud nucleotídica para la región variable F-UTR 5' es de 75,8 % entre dos cepas divergentes de RPV, y de 98,4 % entre dos cepas divergentes de MeV, mientras que es de 51-54 % entre los morbillivirus (Meyer & Diallo 1995). Este hecho indica que existe la necesidad de amplificar esta región del genoma en las cepas PWMV o PWMV-like si se quiere avanzar en el conocimiento de la relación existente entre las diferentes cepas de CeMV.

Por otra parte, debido a que la región hidrofóbica N-terminal (aa 1-25) se considera una región específica de cada especie de morbillivirus, seguramente por sus funciones ligadas a aquellas de la célula hospedadora (Bolt et al. 1994, Meyer & Diallo 1995); dicha región podría estar ligada a una especie hospedadora dada. Como esta mutación no existe en la secuencia DMV_Sc/2007, la mutación (2 A→V) (Artículo 2, Figura 2, nt 5281) podría estar asociada con una adaptación de esta cepa a los *G. melas* (Artículo 2 2011).

Otro dato refuerza esta hipótesis, ya que se ha amplificado esta zona analizando otros cinco *G. melas* y tres *S. coeruleoalba* varados en la costa española mediterránea en 2007. Para ello, se ha utilizado los cebadores M3 (+): 5'- CACAGATCCTCTCCTCG-3', posición en el genoma 4743-4759 (Bolt et al. 1994) y CeMV-F52 (-):5'- CAATGGATTTGCCCTTCAGT-3', posición en el genoma 5343-5362 (dato no publicado) (Protocolo 9); y se ha verificado que todos los *G. melas* (5/5) presentaban una valina en esta posición, y todos los *S. coeruleoalba* (3/3), un adenina (dato no publicado).

V.1.4 Nueva nomenclatura para los tres grupos de cepas de CeMV

En 1996, Taubenberger et al. subrayaron que, como PMV y DMV producían infección en hospedadores de diversas especies de odontocetos, y no exclusivamente en marsopa y delfín respectivamente, podría ser mejor designar éstos virus como “morbillivirus de cetáceo 1/ CeMV-1” para PMV, ya que ha sido el primer CeMV detectado (McCullough et al. 1991) y “morbillivirus de cetáceo 2/ CeMV-2”, para DMV (Taubenberger et al. 1996).

Dicha proposición (CeMV-1 y CeMV-2) no tuvo eco en la comunidad científica, y en la actualidad se sigue considerando la nomenclatura original (PMV, DMV y PWMV).

Después de 2005, se ha hallado PWMV en *G. melas*, así como PWMV-like en un *G. macrorhynchus*, y cepas de DMV en *K. breviceps* y *L. albirostris*, y *G. melas* (Taubenberger et al. 2000, Yang et al. 2006, Wohlsein et al. 2007, Artículo 1 2011). En este sentido, sería interesante seguir las designaciones propuestas por Taubenberger et al. (1996) y proponer un tercer grupo “morbillivirus de cetáceo 3/ CeMV-3” que agrupe PWMV y PWMV-like.

La propuesta de una nueva nomenclatura tiene como objetivo evitar confusiones. En efecto, no existe concordancia, a veces, entre el CeMV hallado y la especie hospedadora, por ejemplo, cuando DMV afecta a *G. melas* (Fernández et al. 2008), o PMV a *T. truncatus* (Taubenberger et al. 1996).

Es posible que en un futuro se disponga de un mayor número de secuencias, y que la información obtenida de lugar a la necesidad de separar CeMV-3 para PWMV, y CeMV-4 para PWMV-like, siendo posiblemente cada una de estas cepas mejor adaptada a su hospedador, respectivamente el *G. melas* y el *G. macrorhynchus* (Artículo 1 2011).

V.2 HV: nueva nomenclatura

Al empezar esta Tesis se disponía de 21 secuencias de HV de cetáceo (Tabla 8) (Blanchard et al. 2001, Manire et al. 2006, Saliki et al. 2006, Smolarek Benson et al. 2006, van Elk et al. 2009). En esta Tesis se han obtenido otras 9 (Artículo 3 2010, Artículo 4 2010).

Otras 7 han salido posteriormente, una que ya se ha mencionado (Soto et al. 2011a), así como otras seis (Maness et al. 2011, Miyoshi et al. 2011). Las seis restantes se corresponden con cuatro α -HV en las siguientes especies: *Pseudorca crassidens* (falsa orca), *Peponocephala electra* (delfín de cabeza de melón), *Tursiops truncatus* y *Orcinus orca*; así como dos γ -HV en un *Mesoplodon stejnegeri* (Zifio de Stejneger o zifio del mar de Bering) y un *Physeter macrocephalus* (Maness et al. 2011, Miyoshi et al. 2011).

Como consecuencia, se ha elevado a 37 el número de secuencias descritas de HV de cetáceos frente a las 21 cuando se comenzó esta Tesis. Como se ha explicado anteriormente, tres secuencias halladas en dos especies distintas, han sido casi idénticas (Artículo 3, 2010, Artículo 4, 2010, Soto et al. 2011a).

Debido a que los autores suelen proponer a una secuencia nueva, un nombre acorde con la especie hospedadora, por ejemplo, el mismo nombre “Bottlenose dolphin herpesvirus” (herpesvirus de delfín mular) se repite en un número alto de veces para designar a una serie de secuencias distintas (Miyoshi et al. 2011). Todo ello exige una nomenclatura unificadora.

En este sentido y siguiendo una nomenclatura acorde con el ICTV, recientemente Maness et al. (2011) proponen nombres tentativos de los HV de mamíferos marinos en correspondencia con la denominación de la familia del hospedador. Por ejemplo, denominan la primera secuencia descrita en un *T. truncatus* (Blanchard et al. 2001): Delphinid Herpesvirus 1 (DeHV-1) y así sucesivamente hasta DeHV-9 para la familia *Delphinidae*; también proponen dos nombres para otras dos secuencias halladas en dos otras familias de hospedadores: Kogiid Herpesvirus 1 (KoHV-1) y Ziphiid Herpesvirus 1 (ZiHV-1).

Cuando se publicó el artículo de Maness et al. (2011) no existía ninguna ambigüedad en la terminología elegida, ya que cada secuencia se asociaba a un hospedador natural diferente. Sin embargo, al día de hoy, se observa que las últimas ramas de un mismo clado pueden compartir secuencias de HV halladas en especies de cetáceos de diferentes géneros e incluso familias (Artículo 3, 2010, Artículo 4, 2010, Soto et al. 2011a). En consecuencia, debido a que tres cepas de α -HV casi idénticas se han hallado en un *Z. cavirostris* y dos *S. coeruleoalba*, se dificulta la denominación de este posible nuevo α -HV dentro de los Ziphiid-HV o de los Delphinid-HV.

Aunque la nomenclatura propuesta por Maness et al. (2011) podría ser prematura, es un modelo interesante a seguir para facilitar la comparación de nuevas secuencias y comprobar si existe relación entre las secuencias que se clasifican juntas, la especie hospedadora y las lesiones. En este estudio filogenético (Artículo 3, 2010, Artículo 4, 2010) así como en los otros publicados hasta la fecha (Miyoshi et al. 2011), se observa que las secuencias halladas de HV de cetáceos se clasifican juntas, separadas de las secuencias de las otras especies de HV. Estos agrupamientos podrían ser consecuentes de una coevolución de las diferentes cepas de HV con sus hospedadores (McGeoch et al. 2006, Smolarek Benson et al. 2006).

Sin embargo, para tener una valoración más cercana a la realidad, sería importante conseguir regiones del gen de la ADN polimerasa de una longitud de 350-730 pb como lo han conseguido otros autores (Smolarek Benson et al. 2006, van Elk et al. 2009, Maness et al. 2011). De esta forma, comparando secuencias de mayor tamaño, se podrían diferenciar dos secuencias que en principio son iguales sobre una longitud de 170-180 pb, pero que podrían diferenciarse cuando la longitud conseguida sea de 350-730 pb.

En conclusión, como la clasificación filogenética puede diferir según la longitud del fragmento estudiado (Maness et al. 2011), además de comparar los árboles filogenéticos de la región del gen de la ADN polimerasa en diferentes longitudes (Smolarek Benson et al. 2006), sería interesante compararlos con el árbol filogenético del gen de la ADN-terminasa (Hargis et al. 1999), y verificar si las secuencias se clasifican de igual modo (Blanchard et al. 2001), y con ello, conseguir que la clasificación de los HV de cetáceos sea más robusta.

CONCLUSIONES

1. Se ha encontrado una secuencia de CeMV en un calderón tropical (*Globicephala macrorhynchus*) varado en 1996 en Tenerife. Esta cepa se ha denominado PWMV-like y es un 97 % similar a la cepa PWMV hallada previamente en un calderón común (*Globicephala melas*) varado en la costa este de EEUU. Las dos cepas PWMV y PWMV-like definen un tercer clado, diferente de PMV y DMV, dentro de CeMV.
2. La comparación de dos genomas de DMV sobre gran parte de su longitud (9050 pb de un total de 15702pb), hallados en dos hospedadores diferentes, un delfín listado (*Stenella coeruleoalba*) y un calderón común (*Globicephala melas*) en el brote de 2007 del Mediterráneo, mostró que las dos cepas eran casi idénticas (99,9 % de similitud), y por tanto, podrían ser el mismo virus.
3. La comparación de los genomas de 9050 pb de DMV hallados en el brote de 2007 del Mediterráneo, con la cepa del brote anterior ocurrido en 1990, mostró que las cepas del virus de 2007 eran similares en un 99,3-99,4 % a la cepa española mediterránea de 1990 hallada en delfines listados (*Stenella coeruleoalba*), y por tanto, el brote de 2007 pudo tener un origen mediterráneo.
4. Molecularmente, se ha observado coinfección CeMV-HV. Se han hallado ocho nuevas secuencias de herpesvirus (HV) en una especie hospedadora, el delfín listado (*Stenella coeruleoalba*), en la que no se había descrito nunca infección por HV. Concretamente, en cinco animales muertos por CeMV en el Mar Mediterráneo, área geográfica donde nunca se había descrito infección por HV en cetáceos. Su detección se atribuye a la presencia de HV como agente secundario a CeMV. Siete de ellas han sido clasificadas dentro de la subfamilia *alphaherpesvirinae* y una dentro de la subfamilia *gammaherpesvirinae*.
5. Se ha detectado una cepa de HV de cetáceo en un zifio de Cuvier (*Ziphius cavirostris*) con infección sistémica. Se trata de una especie hospedadora donde nunca se había descrito infección por HV, y de una nueva región geográfica, el archipiélado canario. Esta cepa es casi idéntica a dos halladas en delfines listados (*Stenella coeruleoalba*) del Mediterráneo.

6. El DMV podría ser endémico en las poblaciones mediterráneas de delfín listado (*Stenella coeruleoalba*) y haberse producido un salto de especie a una nueva especie hospedadora, el calderón común (*Globicephala melas*), mediante una mutación en la proteína de fusión. En el extremo N-terminal del gen F, se ha detectado que el aminoácido 2 es una adenina en todos los *S. coeruleoalba* testados (4/4) y una valina en todos los *G. melas* (6/6), resultados que indican que esta mutación podría ser especie-específica.

7. Con el fin de facilitar su denominación, ya que el nombre actual no se corresponde siempre con el hospedador, se propone adoptar una nomenclatura para el tercer grupo de cepas de CeMV: así CeMV-3 serían las cepas PWMV y PWMV-like. En cuanto a los HV, debido a que se han hallado tres cepas de α -HV casi idénticas, una en un *Z. cavirostris* y dos en dos *S. coeruleoalba*, se dificulta la denominación de este posible nuevo α -HV como Ziphiid-HV o Delphinid-HV.

RECOMENDACIONES

Brevemente se ha querido resaltar algunas recomendaciones que han surgido en base a este estudio:

1. Sería importante ampliar los estudios moleculares de CeMV detectados en *Globicephala* sp. para determinar de qué tipo de CeMV podrían ser portadores asintomáticos (CeMV-1, CeMV-2 o CeMV-3).
2. En la actualidad, las regiones a amplificar para caracterizar un nuevo CeMV, teniendo en cuenta el número de secuencias disponibles en el GenBank para cada región y el nivel de información que proporciona, por orden de prioridad son: la región P, la región N1, la región N2, la región H y la región F.
3. En ocasiones se ha demostrado la patogenicidad de los HV de cetáceos, y en otras no, por lo que es necesario realizar un mayor número de estudios moleculares asociados a los de anatomía patológica para intentar determinar el rango de hospedador natural para cada especie de HV y su grado de patogenicidad.
4. Tanto los estudios de CeMV como de HV deberían incluir herramientas no sólo moleculares (aumentar el rastreo y realizar caracterizaciones más completas de los genomas), sino también técnicas como la epidemiología espacio-temporal, la evaluación del sistema inmune del hospedador y la vigilancia serológica.

REFERENCIAS

- Aguilar A, Borrell A (1994) Abnormally high polychlorinated biphenyl levels in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) affected by the 1990-1992 Mediterranean epizootic. *Sci Total Environ* 154:237-247
- Aguilar A, Borrell A (2005) DDT and PCB reduction in the western Mediterranean from 1987 to 2002, as shown by levels in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*). *Mar Environ Res* 59:391-404
- Aguilar A, Raga JA (1993) The striped dolphin epizootic in the Mediterranean Sea. *Ambio* 22:524-528
- Anderson DM (1994) Red tides. *Sci Am* 271:62-68
- Artículo 1 (2011) Phylogenetic analysis of a new Cetacean morbillivirus from a short-finned pilot whale stranded in the Canary Islands. *Res Vet Sci* 90:324-328
- Artículo 2 (2011) Genetic comparison among dolphin morbillivirus in the 1990-1992 and 2006-2008 Mediterranean outbreaks. *Infect Genet Evol* 11:1913-1920
- Artículo 3 (2010) Presence of herpesvirus in striped dolphins stranded during the cetacean morbillivirus epizootic along the Mediterranean Spanish coast in 2007. *Arch Virol* 155:1307-1311
- Artículo 4 (2010) Herpesvirus infection with severe lymphoid necrosis affecting a beaked whale stranded in the Canary Islands. *Dis Aquat Org* 89:261-264
- Aznar FJ, Perdiguerro D, Perez del Olmo A, Repulles A, Agusti C, Raga JA (2005) Changes in epizootic crustacean infestations during cetacean die-offs: the mass mortality of Mediterranean striped dolphins *Stenella coeruleoalba* revisited. *Dis Aquat Organ* 67:239-247
- Baker JR (1992) Skin disease in wild cetaceans from British waters. *Aquatic Mammals* 18:27-32
- Banyard AC, Grant RJ, Romero CH, Barrett T (2008) Sequence of the nucleocapsid gene and genome and antigenome promoters for an isolate of porpoise morbillivirus. *Virus Res* 132:213-219
- Banyard AC, Tiwari A, Barrett T (2011) Morbillivirus infection in pilot whales: strict protein requirement drives genetic conservation. *Arch Virol* 156:1853-1859
- Barr B, Dunn JL, Daniel MD, Banford A (1989) Herpes-like viral dermatitis in a beluga whale (*Delphinapterus leucas*). *J Wildl Dis* 25:608-611
- Barrett T, Blixenkrone-Moller M, Di Guardo G, Domingo M, Duignan P, Hall A, Mamaev L, Osterhaus AD (1995) Morbilliviruses in aquatic mammals: report on round table discussion. *Vet Microbiol* 44:261-265
- Barrett T, Visser IK, Mamaev L, Goatley L, van Bresse MF, Osterhaus AD (1993) Dolphin and porpoise morbilliviruses are genetically distinct from phocine distemper virus. *Virology* 193:1010-1012
- Bellièrre EN (2008) Puesta a punto de técnicas moleculares para el diagnóstico de morbillivirus y herpesvirus de cetáceos. Suficiencia investigadora dentro del programa: Desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico molecular de enfermedades. Departamento de Sanidad Animal, U. C. M.
- Birkun A, Jr., Kuiken T, Krivokhizhin S, Haines DM, Osterhaus AD, van de Bildt MW, Joiris CR, Siebert U (1999) Epizootic of morbilliviral disease in common dolphins (*Delphinus delphis ponticus*) from the Black sea. *Vet Rec* 144:85-92
- Black FL (1991) Epidemiology of paramyxoviruses In: Kingsbury D (ed) *The paramyxoviruses*. Plenum Press, New York, p 509-536
- Blanchard TW, Santiago NT, Lipscomb TP, Garber RL, McFee WE, Knowles S (2001) Two novel alphaherpesviruses associated with fatal disseminated infections in Atlantic bottlenose dolphins. *J Wildl Dis* 37:297-305
- Blixenkrone-Moller M, Bolt G, Gottschalck E, Kenter M (1994) Comparative analysis of the gene encoding the nucleocapsid protein of dolphin morbillivirus reveals its distant

Referencias

- evolutionary relationship to measles virus and ruminant morbilliviruses. *J Gen Virol* 75 (Pt 10):2829-2834
- Blixenkrone-Møller M, Bolt G, Jensen TD, Harder T, Svansson V (1996) Comparative analysis of the attachment protein gene (H) of dolphin morbillivirus. *Virus Res* 40:47-55
- Bolt G, Blixenkrone-Møller M, Gottschalck E, Wishaupt RG, Welsh MJ, Earle JA, Rima BK (1994) Nucleotide and deduced amino acid sequences of the matrix (M) and fusion (F) protein genes of cetacean morbilliviruses isolated from a porpoise and a dolphin. *Virus Res* 34:291-304
- Bompar J-M, Dhermain F, Poitevin F, Cheylan M (1991) Les dauphins méditerranéens victimes d'un virus mortel. *La recherche* 22:506-508
- Borrell A, Aguilar A, Corsolini S, Focardi S (1996) Evaluation of toxicity and sex-related variation of PCB levels in Mediterranean striped dolphins affected by an epizootic. *Chemosphere* 32:2359-2369
- Bortolotto A, Casini L, Stanzani LA (1992) Dolphin mortality along the southern Italian coast (June-September 1991). *Aquatic Mammals* 18:56-60
- Bossart GD (1999) The Florida manatee: on the verge of extinction? *J Am Vet Med Assoc* 214:1178-1183
- Bossart GD (2010) Marine Mammals as Sentinel Species for Oceans and Human Health. *Vet Pathol*
- Bossart GD, Brawner TA, Cabal C, Kuhns M, Eimstad EA, Caron J, Trimm M, Bradley P (1990) Hepatitis B-like infection in a Pacific white-sided dolphin (*Lagenorhynchus obliquidens*). *J Am Vet Med Assoc* 196:127-130
- Bossart GD, Cray C, Solorzano JL, Decker SJ, Cornell LH, Altman NH (1996) Cutaneous papillomaviral-like papillomatosis in a killer whale (*Orcinus orca*). *Marine Mammal Science* 12:274-281
- Bossart GD, Reif JS, Schaefer AM, Goldstein J, Fair PA, Saliki JT (2010) Morbillivirus infection in free-ranging Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from the Southeastern United States: seroepidemiologic and pathologic evidence of subclinical infection. *Vet Microbiol* 143:160-166
- Bracht AJ, Brudek RL, Ewing RY, Manire CA, Burek KA, Rosa C, Beckmen KB, Maruniak JE, Romero CH (2006) Genetic identification of novel poxviruses of cetaceans and pinnipeds. *Arch Virol* 151:423-438
- Buck C, Paulino GP, Medina DJ, Hsiung GD, Campbell TW, Walsh MT (1993) Isolation of St. Louis encephalitis virus from a killer whale. *Clin Diagn Virol* 1:109-112
- Caldeira K, Wickett ME (2003) Oceanography: anthropogenic carbon and ocean pH. *Nature* 425:365
- Calzada N, Lockyer CH, Aguilar A (1994) Age and sex composition of the striped dolphin die-off in the Western Mediterranean. *Marine Mammal Science* 10:299-310
- Cámara S (2007) Evaluación de los efectos inmunotoxicológicos de contaminantes ambientales en las células inmunes del delfín mular. Tesis. Universidad Complutense de Madrid.
- Cassonnet P, Van Bresse MF, Desaintes C, Van Waerebeek K, Orth G (1998) Papillomaviruses cause genital warts in small cetaceans from Peru. The World Marine Mammal Science Conference, Monaco, January 1998 (abstract).
- Castrillon J, Gomez-Campos E, Aguilar A, Berdie L, Borrell A (2010) PCB and DDT levels do not appear to have enhanced the mortality of striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) in the 2007 Mediterranean epizootic. *Chemosphere* 81:459-463
- Cosby SL, McQuaid S, Duffy N, Lyons C, Rima BK, Allan GM, McCullough SJ, Kennedy S, Smyth JA, McNeilly F, Craig C, Orvell C (1988) Characterization of a seal morbillivirus. *Nature* 336:115-116
- Culik BM (2004) Review of small cetaceans. Distribution, Behaviour, Migration and Threats, Compiled for CMS by Boris M. Culik, UNEP/CMS Secretariat, Bonn, Germany. 343 pages.
- De Guise S, Lagacé A, Béland P (1994) Gastric papillomas in eight St. Lawrence beluga whales (*Delphinapterus leucas*). *J Vet Diagn Invest* 6:385-388

- De Stephanis R, Urkiola E (2006) Collisions between ships and cetaceans in Spain Report to the Scientific Committee of the International Whaling Commission Annual Meeting St Kitts SC/58/BC5: 6pp. , Available at: http://www.iwcoffice.org/_documents/sci_com/SC58docs/SC-58-BC5.pdf
- De Stephanis R, Verborgh P, Gauffier P (2009) Las poblaciones de calderón común *Globicephala melas* en el Estrecho de Gibraltar. MIGRES Revista de Ecología 1:37-45
- Di Guardo G, Agrimi U, Morelli L, Cardeti G, Terracciano G, Kennedy S (1995) Post mortem investigations on cetaceans found stranded on the coasts of Italy between 1990 and 1993. Vet Rec 136:439-442
- Di Guardo G, Marruchella G, Agrimi U, Kennedy S (2005) Morbillivirus infections in aquatic mammals: a brief overview. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med 52:88-93
- Diallo A, Barrett T, Barbron M, Meyer G, Lefevre PC (1994) Cloning of the nucleocapsid protein gene of peste-des-petits-ruminants virus: relationship to other morbilliviruses. J Gen Virol 75 (Pt 1):233-237
- Dietz R, Heide-Jorgensen MP, Harkonen T (1989) Mass deaths of harbor seals (*Phoca vitulina*) in Europe. Ambio 18:258-264
- Domingo M, Ferrer L, Pumarola M, Marco A, Plana J, Kennedy S, McAliskey M, Rima BK (1990) Morbillivirus in dolphins. Nature 348:21
- Domingo M, Kennedy S, Van Bresse MF (2002) Marine mammal mass mortalities. In: Marine mammals: biology and conservation. Plenum Publishers, New York: Evans and Raga, Kluwer Academic. Chapter 12, p 425 – 456
- Domingo M, Vilafranca M, Visa J, Prats N, Trudgett A, Visser I (1995) Evidence for chronic morbillivirus infection in the Mediterranean striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*). Vet Microbiol 44:229-239
- Domingo M, Visa J, Pumarola M, Marco AJ, Ferrer L, Rabanal R, Kennedy S (1992) Pathologic and immunocytochemical studies of morbillivirus infection in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*). Vet Pathol 29:1-10
- Duignan PJ, Geraci JR, Raga JA, Calzada N (1992) Pathology of morbillivirus infection in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from Valencia and Murcia, Spain. Can J Vet Res 56:242-248
- Duignan PJ, House C, Geraci JR, Duffy N, Rima BK, Walsh MT, Early G, St Aubin DJ, Sadove S, Koopman H, et al. (1995a) Morbillivirus infection in cetaceans of the western Atlantic. Vet Microbiol 44:241-249
- Duignan PJ, House C, Geraci JR, Early G, Copland HG, Walsh MT, Bossart GD, Cray C, Sadove S, St. Aubin DJ, Moore M (1995b) Morbillivirus infection in two species of pilot whales (*Globicephala sp.*) from the western Atlantic. Marine Mammal Science 11:150-162
- Duignan PJ, House C, Odell DK, Wells RS, Hansen LJ, Walsh MT, St Aubin DJ, Rima BK, Geraci JR (1996) Morbillivirus in bottlenose dolphins: evidence for recurrent epizootics in the Western Atlantic and Gulf of Mexico. Marine Mammal Science 12:495-515
- Duignan PJ, House C, Walsh MT, Campbell T, Bossart GD, Duffy N, Fernandes PJ, Rima BK, Wright S, Geraci JR (1995c) Morbillivirus infection in manatees. Marine Mammal Science 11:441-451
- Esperón F (2005) “Contaminantes ambientales en odontocetos de las Islas Canarias. Implicaciones sanitarias”. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Esperón F, Fernández A, Sánchez-Vizcaíno JM (2008) Herpes simplex-like infection in a bottlenose dolphin stranded in the Canary Islands. Dis Aquat Organ 81:73-76
- Esperón F, García-Párraga D, Bellière EN, Sánchez-Vizcaíno JM (2012) Molecular diagnosis of lobomycosis-like disease in a bottlenose dolphin in captivity. Med Mycol 50:106-109
- Fenner F, Gibbs E, Murphy F, Rott R, Studdert MJ, White D (1993) Chapter 18: *Herpesviridae*. In: Veterinary Virology. Academic Press, Inc, London, p 301-325
- Fernandez A, Edwards JF, Rodriguez F, Espinosa de los Monteros A, Herraez P, Castro P, Jaber JR, Martin V, Arbelo M (2005) "Gas and fat embolic syndrome" involving a mass stranding of beaked whales (family Ziphiidae) exposed to anthropogenic sonar signals. Vet Pathol 42:446-457

Referencias

- Fernández A, Esperón F, Herraéz P, de Los Monteros AE, Clavel C, Bernabé A, Sánchez-Vizcaino JM, Verborgh P, DeStephanis R, Toledano F, Bayón A (2008) Morbillivirus and pilot whale deaths, Mediterranean Sea. *Emerg Infect Dis* 14:792-794
- Fournier M, Degas V, Colborn T, Omara FO, Denizeau F, Potworowski EF, Brousseau P (2000) Immunosuppression in mice fed on diets containing beluga whale blubber from the St Lawrence estuary and the Arctic populations. *Toxicol Lett* 112-113:311-317
- Gambaiani DD, Mayol P, Isaac SJ, Simmonds MP (2009) Potential impacts of climate change and greenhouse gas emissions on Mediterranean marine ecosystems and cetaceans. *Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom* 89:179-201
- Geraci JR (1989) Clinical investigations of the 1987-88 mass mortality of bottlenose dolphins along the U.S. central and south Atlantic coast. Final report to National Marine Fisheries Service and US Navy Office of Naval Research, and Marine Mammal Commission. Guelph, Ontario, Canada.pp. 1-63
- Geraci JR, Harwood J, Lounsbury VJ (1999) Marine mammal die-offs: causes, investigations, and issues. In: Twiss Jr., J.R., and R.R. Reeves (Eds.). *Conservation and management of marine mammals*. Smithsonian Institution Press:367-395
- Geraci JR, Hicks BD, St Aubin DJ (1979) Dolphin pox: a skin disease of cetaceans. *Can J Comp Med* 43:399-404
- Geraci JR, Lounsbury VJ (2005) *Marine Mammals Ashore: A Field Guide for Strandings*, Vol. Second Edition. National Aquarium in Baltimore, Baltimore, MD
- Gibson DI, Harris EA, Bray RA, Jepson PD, Kuiken T, Baker JR, Simpson VR (1998) A survey of the helminth parasites of cetaceans stranded on the coast of England and Wales during the period 1990-1994. *Journal of Zoology (London)* 244:563-574
- Gottschling M, Bravo IG, Schulz E, Bracho MA, Deaville R, Jepson PD, Van Bressem MF, Stockfleth E, Nindl I (2011) Modular organizations of novel cetacean papillomaviruses. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 59:34-42
- Haffar A, Libeau G, Moussa A, Cecile M, Diallo A (1999) The matrix protein gene sequence analysis reveals close relationship between peste des petits ruminants virus (PPRV) and dolphin morbillivirus. *Virus Res* 64:69-75
- Hargis AM, Ginn PE, Mansell JEKL, Garber RL (1999) Ulcerative facial and nasal dermatitis and stomatitis in cats associated with feline herpesvirus 1. *Veterinary Dermatology* 10:267-274
- Heaney J, Barrett T, Cosby SL (2002) Inhibition of in vitro leukocyte proliferation by morbilliviruses. *J Virol* 76:3579-3584
- Hess C, Maegdefrau-Pollan B, Bilic I, Liebhart D, Richter S, Mitsch P, Hess M (2011) Outbreak of Cutaneous Form of Poxvirus on a Commercial Turkey Farm Caused by the Species Fowlpox. *Avian Diseases* 55:714-718
- Hinshaw VS, Bean WJ, Geraci J, Fiorelli P, Early G, Webster RG (1986) Characterization of two influenza A viruses from a pilot whale. *J Virol* 58:655-656
- ICTV (2002) ICTVdb index of viruses (on line). International Committee on Taxonomy of Viruses, UK. Available from: <http://www.ictvdb.rothamsted.ac.uk/Ictv/index.htm>
- Inskeep W, 2nd, Gardiner CH, Harris RK, Dubey JP, Goldston RT (1990) Toxoplasmosis in Atlantic bottle-nosed dolphins (*Tursiops truncatus*). *J Wildl Dis* 26:377-382
- Jauniaux T, Charlier G, Desmecht M, Coignoul F (1998) Lesions of morbillivirus infection in a fin whale (*Balaenoptera physalus*) stranded along the Belgian coast. *Vet Rec* 143:423-424
- Jauniaux T, Charlier G, Desmecht M, Haelters J, Jacques T, Losson B, Van Gompel J, Tavernier J, Coignoul F (2000) Pathological findings in two fin whales (*Balaenoptera physalus*) with evidence of morbillivirus infection. *J Comp Pathol* 123:198-201
- Kannan K, Tanabe S, Borrell A, Aguilar A, Focardi S, Tatsukawa R (1993) Isomer-specific analysis and toxic evaluation of polychlorinated biphenyls in striped dolphins affected by an epizootic in the western Mediterranean sea. *Arch Environ Contam Toxicol* 25:227-233

- Keck N, Kwiatek O, Dhermain F, Dupraz F, Boulet H, Danes C, Laprie C, Perrin A, Godenir J, Micout L, Libeau G (2010) Resurgence of Morbillivirus infection in Mediterranean dolphins off the French coast. *Vet Rec* 166:654-655
- Kennedy-Stoskopf S (2001) Viral Diseases (Chapter 15). In: Dierauf L, Gulland F (eds) *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine*. CRC Press, Boca Raton, FL., p 285-303
- Kennedy S (1998) Morbillivirus infections in aquatic mammals. *J Comp Pathol* 119:201-225
- Kennedy S (2001) Morbillivirus infections in aquatic mammals. In: *Infectious Diseases of Wild Mammals*. Third edition, published by Manson Publishing, The Veterinary Press, London, p 64-76
- Kennedy S, Kuiken T, Ross HM, McAliskey M, Moffett D, McNiven CM, Carole M (1992a) Morbillivirus infection in two common porpoises (*Phocoena phocoena*) from the coasts of England and Scotland. *Vet Rec* 131:286-290
- Kennedy S, Lindstedt IJ, McAliskey MM, McConnell SA, McCullough SJ (1992b) Herpesviral encephalitis in a harbour porpoise (*Phocoena phocoena*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 23:374-379
- Kennedy S, Smyth JA, Cush PF, McAliskey M, McCullough SJ, Rima BK (1991) Histopathologic and immunocytochemical studies of distemper in harbor porpoises. *Vet Pathol* 28:1-7
- Kennedy S, Smyth JA, Cush PF, McCullough SJ, Allan GM, McQuaid S (1988a) Viral distemper now found in porpoises. *Nature* 336:21
- Kennedy S, Smyth JA, McCullough SJ, Allan GM, McNeilly F, McQuaid S (1988b) Confirmation of cause of recent seal deaths. *Nature* 335:404
- Kiszka J, Van Bressem MF, Pusineri C (2009) Lobomycosis-like disease and other skin conditions in Indo-Pacific bottlenose dolphins *Tursiops aduncus* from the Indian Ocean. *Dis Aquat Organ* 84:151-157
- Krafft A, Lichy JH, Lipscomb TP, Klaunberg BA, Kennedy S, Taubenberger JK (1995) Postmortem diagnosis of morbillivirus infection in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in the Atlantic and Gulf of Mexico epizootics by polymerase chain reaction-based assay. *J Wildl Dis* 31:410-415
- Lambertsen RH, Kohn BA, Sundberg JP, Buergelt CD (1987) Genital papillomatosis in sperm whale bulls. *J Wildl Dis* 23:361-367
- Lavigne DM, Schmitz OJ (1990) Global warming and increasing population densities: a prescription for seal plagues. *Marine Pollution Bulletin* 21:280-284
- Lipscomb TP, Kennedy S, Moffett D, Ford BK (1994a) Morbilliviral disease in an Atlantic bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) from the Gulf of Mexico. *J Wildl Dis* 30:572-576
- Lipscomb TP, Kennedy S, Moffett D, Krafft A, Klaunberg BA, Lichy JH, Regan GT, Worthy GA, Taubenberger JK (1996) Morbilliviral epizootic in bottlenose dolphins of the Gulf of Mexico. *J Vet Diagn Invest* 8:283-290
- Lipscomb TP, Schulman FY, Moffett D, Kennedy S (1994b) Morbilliviral disease in Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from the 1987-1988 epizootic. *J Wildl Dis* 30:567-571
- Lvov DK, Zdanov VM, Sazonov AA, Braude NA, Vladimirtceva EA, Agafonova LV, Skljanskaja EI, Kaverin NV, Reznik VI, Pysina TV, Oserovic AM, Berzin AA, Mjasnikova IA, Podcernjaeva RY, Klimenko SM, Andrejev VP, Yakhno MA (1978) Comparison of influenza viruses isolated from man and from whales. *Bull World Health Organ* 56:923-930
- Mahy BWJ, Barrett T, Evans S, Anderson EC, Bostock CJ (1988) Characterization of a seal morbillivirus. *Nature* 336:115
- Mancia A, Chapman RW, Gattoni-Celli S, Baatz JE (2010) From DNA to RNA to Proteins: Molecular approaches to decipher dolphin's genetic information (Chapter 3). In: Pearce AG, Correa LM (eds) *Dolphins: Anatomy, Behavior and Threats (Animal Science, Issues and Professions)*. Nova Science Publishers, Inc., New York, p 79-105

Referencias

- Maness HT, Nollens HH, Jensen ED, Goldstein T, LaMere S, Childress A, Sykes J, St Leger J, Lacave G, Latson FE, Wellehan JF, Jr. (2011) Phylogenetic analysis of marine mammal herpesviruses. *Vet Microbiol* 149:23-29
- Manire CA, Smolarek KA, Romero CH, Kinsel MJ, Clauss TM, Byrd L (2006) Proliferative dermatitis associated with a novel alphaherpesvirus in an Atlantic bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *J Zoo Wildl Med* 37:174-181
- Martineau D (2007) Potential synergism between stress and contaminants in free-ranging cetaceans. *Int J Comp Psychol* 20:194-216
- Martineau D, Lagace A, Beland P, Higgins R, Armstrong D, Shugart LR (1988) Pathology of stranded beluga whales (*Delphinapterus leucas*) from the St. Lawrence Estuary, Quebec, Canada. *J Comp Pathol* 98:287-311
- McCullough SJ, McNeilly F, Allan GM, Kennedy S, Smyth JA, Cosby SL, McQuaid S, Rima BK (1991) Isolation and characterisation of a porpoise morbillivirus. *Arch Virol* 118:247-252
- McGeoch DJ, Rixon FJ, Davison AJ (2006) Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus Res* 117:90-104
- Melero M, Rubio-Guerri C, Crespo JL, Arbelo M, Vela AI, Garcia-Parraga D, Sierra E, Dominguez L, Sanchez-Vizcaino JM (2011) First case of erysipelas in a free-ranging bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) stranded in the Mediterranean Sea. *Dis Aquat Organ* 97:167-170
- Meyer G, Diallo A (1995) The nucleotide sequence of the fusion protein gene of the peste des petits ruminants virus: the long untranslated region in the 5'-end of the F-protein gene of morbilliviruses seems to be specific to each virus. *Virus Res* 37:23-35
- Mihindukulasuriya KA, Wu G, St Leger J, Nordhausen RW, Wang D (2008) Identification of a novel coronavirus from a beluga whale by using a panviral microarray. *J Virol* 82:5084-5088
- Mikaelian I, Tremblay MP, Montpetit C, Tessaro SV, Cho HJ, House C, Measures L, Martineau D (1999) Seroprevalence of selected viral infections in a population of beluga whales (*Delphinapterus leucas*) in Canada. *Vet Rec* 144:50-51
- Miyoshi K, Nishida S, Sone E, Tajima Y, Makara M, Yoshioka M, Nakamura M, Yamada TK, Koike H (2011) Molecular identification of novel alpha- and gammaherpesviruses from cetaceans stranded on Japanese coasts. *Zoolog Sci* 28:126-133
- Murdoch ME, Reif JS, Mazzoil M, McCulloch SD, Fair PA, Bossart GD (2008) Lobomycosis in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from the Indian River Lagoon, Florida: estimation of prevalence, temporal trends, and spatial distribution. *Ecohealth* 5:289-297
- Newman SJ, Smith SA (2006) Marine mammal neoplasia: a review. *Vet Pathol* 43:865-880
- Nielsen O, Stewart RE, Measures L, Duignan P, House C (2000) A morbillivirus antibody survey of Atlantic walrus, narwhal and beluga in Canada. *J Wildl Dis* 36:508-517
- Nikaido M, Rooney AP, Okada N (1999) Phylogenetic relationships among cetartiodactyls based on insertions of short and long interspersed elements: hippopotamuses are the closest extant relatives of whales. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:10261-10266
- Osterhaus A, Groen J, Niesters H, van de Bilt M, Martina B, Vedder L, Vos J, van Egmond H, Abou-Sidi B, Barham ME (1997) Morbillivirus in monk seal mass mortality. *Nature* 388:838-839
- Osterhaus AD (1988) Seal death. *Nature* 334:301-302
- Osterhaus AD, Broeders HW, Teppema JS, Kuiken T, House JA, Vos HW, Visser IK (1993) Isolation of a virus with rhabdovirus morphology from a white-beaked dolphin (*Lagenorhynchus albirostris*). *Arch Virol* 133:189-193
- Osterhaus AD, de Swart RL, Vos HW, Ross PS, Kenter MJ, Barrett T (1995) Morbillivirus infections of aquatic mammals: newly identified members of the genus. *Vet Microbiol* 44:219-227
- Osterhaus AD, Vedder EJ (1988) Identification of virus causing recent seal deaths. *Nature* 335:20

- Piza J (1991) Striped dolphin mortality in the Mediterranean Proceedings of the Mediterranean Striped Dolphin Mortality International Workshop, ed. X. Pastor and M. Simmonds, Palma de Mallorca, Spain: Greenpeace Mediterranean Sea Project, p 93-103
- Raga JA, Banyard A, Domingo M, Corteyn M, Van Bresse MF, Fernandez M, Aznar FJ, Barrett T (2008) Dolphin morbillivirus epizootic resurgence, Mediterranean Sea. *Emerg Infect Dis* 14:471-473
- Rehtanz M, Ghim SJ, Rector A, Van Ranst M, Fair PA, Bossart GD, Jenson AB (2006) Isolation and characterization of the first American bottlenose dolphin papillomavirus: *Tursiops truncatus* papillomavirus type 2. *J Gen Virol* 87:3559-3565
- Reid SM, Ansell DM, Ferris NP, Hutchings GH, Knowles NJ, Smith AW (1999) Development of a reverse transcription polymerase chain reaction procedure for the detection of marine caliciviruses with potential application for nucleotide sequencing. *J Virol Methods* 82:99-107
- Reidarson TH (2003) Cetacea (Whales, Dolphins, Porpoises). In: Fowler M, Miller ER (eds) *Zoo and Wild Animal Medicine* 5th ed. Saunders, Elsevier Science, Port Melbourne, p 442-459
- Reidarson TH, McBain J, House C, King DP, Stott JL, Krafft A, Taubenberger JK, Heyning J, Lipscomb TP (1998) Morbillivirus infection in stranded common dolphins from the Pacific Ocean. *J Wildl Dis* 34:771-776
- Rima BK, Collin AM, Earle JA (2005) Completion of the sequence of a cetacean morbillivirus and comparative analysis of the complete genome sequences of four morbilliviruses. *Virus Genes* 30:113-119
- Roizmann B, Desrosiers RC, Fleckenstein B, Lopez C, Minson AC, Studdert MJ (1992) The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol* 123:425-449
- Roizmann B, Pellett PE (2001) Chapter 71: The family *Herpesviridae*: a brief introduction. In: Knipe DM, Howley PM (eds) *Fields Virology*, 4th edition Vol 2. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, Pennsylvania, USA, p 2381-2397
- Rotstein DS, Burdett LG, McLellan W, Schwacke L, Rowles T, Terio KA, Schultz S, Pabst A (2009) Lobomycosis in offshore bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*), North Carolina. *Emerg Infect Dis* 15:588-590
- Saliki JT, Cooper EJ, Rotstein DS, Caseltine SL, Pabst DA, McLellan WA, Govett P, Harms C, Smolarek KA, Romero CH (2006) A novel gammaherpesvirus associated with genital lesions in a Blainville's beaked whale (*Mesoplodon densirostris*). *J Wildl Dis* 42:142-148
- Scott GR (1990a) Peste-des-petits-ruminants (goat plague) virus. In: *Virus Infections of Vertebrates*, Vol 3: *Virus Infections of Ruminants*. (Ed by Z. Dinter and B. Morein) Elsevier Science Publisher, BV, Amsterdam, p 355-361
- Scott GR (1990b) Rinderpest virus. In: *Virus Infections of Vertebrates*, Vol 3: *Virus Infections of Ruminants*. (Ed by Z. Dinter and B. Morein) Elsevier Science Publisher, BV, Amsterdam, p 341-354
- Schulman FY, Lipscomb TP, Moffett D, Krafft AE, Lichy JH, Tsai MM, Taubenberger JK, Kennedy S (1997) Histologic, immunohistochemical, and polymerase chain reaction studies of bottlenose dolphins from the 1987-1988 United States Atlantic coast epizootic. *Vet Pathol* 34:288-295
- Smith AW, Skilling DE (1979) Viruses and virus diseases of marine mammals. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 175:918-920
- Smith AW, Skilling DE, Benirschke K, Albert TF, Barlough JE (1987) Serology and virology of the bowhead whale (*Balaena mysticetus* L.). *J Wildl Dis* 23:92-98
- Smolarek Benson K (2005) Molecular identification and genetic characterization of cetacean herpesviruses and porpoise morbilliviruses. PhD thesis, University of Florida
- Smolarek Benson KA, Manire CA, Ewing RY, Saliki JT, Townsend FI, Ehlers B, Romero CH (2006) Identification of novel alpha- and gammaherpesviruses from cutaneous and mucosal lesions of dolphins and whales. *J Virol Methods* 136:261-266

Referencias

- Soto S, Gonzalez B, Willoughby K, Maley M, Olvera A, Kennedy S, Marco A, Domingo M (2011a) Systemic Herpesvirus and Morbillivirus Co-Infection in a Striped Dolphin (*Stenella coeruleoalba*). *J Comp Pathol*
- Soto S, Gonzalez R, Alegre F, Gonzalez B, Medina P, Raga JA, Marco A, Domingo M (2011b) Epizootic of dolphin morbillivirus on the Catalanian Mediterranean coast in 2007. *Vet Rec*
- Taubenberger JK, Tsai M, Krafft AE, Lichy JH, Reid AH, Schulman FY, Lipscomb TP (1996) Two morbilliviruses implicated in bottlenose dolphin epizootics. *Emerg Infect Dis* 2:213-216
- Taubenberger JK, Tsai MM, Atkin TJ, Fanning TG, Krafft AE, Moeller RB, Kodosi SE, Mense MG, Lipscomb TP (2000) Molecular genetic evidence of a novel morbillivirus in a long-finned pilot whale (*Globicephalus melas*). *Emerg Infect Dis* 6:42-45
- Tsur I, Goffman O, Yakobsen B, Moffett D, Kennedy S (1997) Morbillivirus infection in a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) from the Mediterranean Sea. *European Journal of Veterinary Pathology* 2:83-85
- Uchida K, Muranaka M, Horii Y, Murakami N, Yamaguchi R, Tateyama S (1999) Non-purulent meningoencephalomyelitis of a Pacific striped dolphin (*Lagenorhynchus obliquidens*). The first evidence of morbillivirus infection in a dolphin at the Pacific Ocean around Japan. *J Vet Med Sci* 61:159-162
- Van Bresse M, Waerebeek KV, Jepson PD, Raga JA, Duignan PJ, Nielsen O, Di Benedetto AP, Siciliano S, Ramos R, Kant W, Peddemors V, Kinoshita R, Ross PS, Lopez-Fernandez A, Evans K, Crespo E, Barrett T (2001) An insight into the epidemiology of dolphin morbillivirus worldwide. *Vet Microbiol* 81:287-304
- Van Bresse MF, Jepson P, Barrett T (1998a) Further insight on the epidemiology of cetacean morbillivirus in the Northeastern Atlantic. *Marine Mammal Science* 14:605-613
- Van Bresse MF, Raga JA, Di Guardo G, Jepson PD, Duignan PJ, Siebert U, Barrett T, de Oliveira Santos MC, Moreno IB, Siciliano S (2009a) Emerging infectious diseases in cetaceans worldwide and the possible role of environmental stressors. *Dis Aquat Org* 86:143-157
- Van Bresse MF, Van Waerebeek K, Aznar FJ, Raga JA, Jepson PD, Duignan P, Deaville R, Flach L, Viddi F, Baker JR, Di Benedetto AP, Echegaray M, Genova T, Reyes J, Felix F, Gaspar R, Ramos R, Peddemors V, Sanino GP, Siebert U (2009b) Epidemiological pattern of tattoo skin disease: a potential general health indicator for cetaceans. *Dis Aquat Organ* 85:225-237
- Van Bresse MF, Van Waerebeek K, Fleming M, Barrett T (1998b) Serological evidence of morbillivirus infection in small cetaceans from the Southeast Pacific. *Vet Microbiol* 59:89-98
- Van Bresse MF, Van Waerebeek K, Raga JA (1999) A review of virus infections of cetaceans and the potential impact of morbilliviruses, poxviruses and papillomaviruses on host population dynamics. *Dis Aquat Organ* 38:53-65
- Van Bresse MF, Van Waerebeek K, Reyes JC, Dekegel D, Pastoret PP (1993a) Evidence of poxvirus in dusky dolphin (*Lagenorhynchus obscurus*) and Burmeister's porpoise (*Phocoena spinipinnis*) from coastal Peru. *J Wildl Dis* 29:109-113
- Van Bresse MF, Van Waerebeek K, Reyes JC, Félix F (2007) A preliminary overview of skin and skeletal diseases and traumata in small cetaceans from South American waters. *Lat Am J Aquat Mamm* 6:7-42
- Van Bresse MF, Van Waerebeek KV, Piérard GE, Desaintes C (1996) Genital and lingual warts in small cetaceans from coastal Peru. *Diseases of Aquatic Organisms* 26:1-10
- Van Bresse MF, Visser IK, De Swart RL, Orvell C, Stanzani L, Androukaki E, Siakavara K, Osterhaus ADME (1993b) Dolphin morbillivirus infection in different parts of the Mediterranean Sea. *Arch Virol* 129:235-242
- Van Bresse MF, Visser IK, Van de Bildt MW, Teppema JS, Raga JA, Osterhaus AD (1991) Morbillivirus infection in Mediterranean striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*). *Vet Rec* 129:471-472

- van de Bildt MW, Kuiken T, Osterhaus AD (2005) Cetacean morbilliviruses are phylogenetically divergent. *Arch Virol* 150:577-583
- van de Bildt MW, Martina BE, Sidi BA, Osterhaus AD (2001) Morbillivirus infection in a bottlenosed dolphin and a Mediterranean monk seal from the Atlantic coast of West Africa. *Vet Rec* 148:210-211
- van de Bildt MW, Martina BE, Vedder EJ, Androukaki E, Kotomatas S, Komnenou A, Sidi BA, Jiddou AB, Barham ME, Niesters HG, Osterhaus AD (2000) Identification of morbilliviruses of probable cetacean origin in carcasses of Mediterranean monk seals (*Monachus monachus*). *Vet Rec* 146:691-694
- van de Bildt MW, Vedder EJ, Martina BE, Sidi BA, Jiddou AB, Ould Barham ME, Androukaki E, Komnenou A, Niesters HG, Osterhaus AD (1999) Morbilliviruses in Mediterranean monk seals. *Vet Microbiol* 69:19-21
- van Elk CE, van de Bildt MW, de Jong AA, Osterhaus AD, Kuiken T (2009) Genital herpesvirus in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*): cultivation, epidemiology, and associated pathology. *J Wildl Dis* 45:895-906
- Van Regenmortel MH, Bishop DH, Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Calisher CH (1997) Guidelines to the demarcation of virus species. *Arch Virol* 142:1505-1518
- VanDevanter DR, Warrenner P, Bennett L, Schultz ER, Coulter S, Garber RL, Rose TM (1996) Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR. *J Clin Microbiol* 34:1666-1671
- Venn-Watson S, Rivera R, Smith CR, Saliki JT, Caseltine S, St Leger J, Yochem P, Wells RS, Nollens H (2008) Exposure to novel parainfluenza virus and clinical relevance in 2 bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) populations. *Emerg Infect Dis* 14:397-405
- Visser IK, Van Bresseem MF, de Swart RL, van de Bildt MW, Vos HW, van der Heijden RW, Saliki JT, Orvell C, Kitching P, Kuiken T, et al. (1993) Characterization of morbilliviruses isolated from dolphins and porpoises in Europe. *J Gen Virol* 74 (Pt 4):631-641
- Webb J (1991) Dolphin epidemic spreads to Greece. *New scientist* 131:18
- WHO (2001) Standardization of nomenclature for describing the genetic characteristics of the wild-type measles viruses. *Wkly Epidemiol Rec* 76:242-247
- Wohlsein P, Puff C, Kreutzer M, Siebert U, Baumgartner W (2007) Distemper in a dolphin. *Emerg Infect Dis* 13:1959-1961
- Yang WC, Pang VF, Jeng CR, Chou LS, Chueh LL (2006) Morbilliviral infection in a pygmy sperm whale (*Kogia breviceps*) from Taiwanese waters. *Vet Microbiol* 116:69-76
- Zhou X, Xu S, Yang Y, Zhou K, Yang G (2011) Phylogenomic analyses and improved resolution of Cetartiodactyla. *Mol Phylogenet Evol* 61:255-264

ANEXOS

GLOSARIO

Anticuerpos^{*1}: proteínas (inmunoglobulinas) fabricadas por un organismo y destinadas a bloquear la acción de un antígeno.

Antígeno^{*}: proteínas lo más frecuentemente ajenas a un organismo y que lo pueden infectar. Los virus y las bacterias representan ejemplos clásicos de antígenos.

Arbol filogenético o evolutivo: Estructura matemática usada para modelizar la historia evolutiva real de un conjunto de unidades taxonómicas (secuencias, individuos, especies, etcétera).

Bacteria^{*}: ser vivo unicelular procariota, es decir, del cual el ácido nucleico no está envuelto de un núcleo como en los eucariotas (todos los demás seres vivos, unicelulares o no). Varias enfermedades están causadas por bacterias específicas.

Balaenoptera acutorostrata: rorcual aliblanco (minke whale)

Balaena mysticetus: ballena boreal (bowhead whale)

Balaenoptera physalus: rorcual común (fin whale)

Biodiversidad^{*}: conjunto de seres vivos presentes en la Tierra en un momento determinado, incluyendo la diversidad genética intraespecífica y los ecosistema.

Blubber: capa de grasa subcutánea que actúa de aislante en cetáceos.

Cepa^{*}: sub-población de un microorganismo aislado de un individuo contaminado.

Cephalorhynchus hectori : delfín de Héctor (Hector's dolphin)

Clado: Grupo monofilético, grupo que incluye todos los taxones descendientes de un taxón ancestral.

Delphinapterus leucas : beluga (beluga whale)

Delphinus capensis: delfín común a pico largo (long-beaked common dolphin)

Delphinus delphis: delfín común (common dolphin)

Ecolocación: La ecolocación se asemeja al funcionamiento de un sonar activo; el animal emite un sonido que rebota al encontrar un obstáculo y analiza el eco recibido. Logra así, saber la distancia hasta el objeto (u objetos), midiendo el tiempo de retardo entre la señal que ha emitido y la que ha recibido.

Emaciado: Sinónimo de “Demacrado”. Persona o animal que está bajo de peso.

¹ Las definiciones señaladas con un asterisco* se han adaptado del libro “La vengeance de la civette masquée”, François Moutou. Le pommier (ed.), 2007.

Endémico o Enzoótico*: enfermedad clínicamente expresada o no, en una población en un lugar concreto.

Enfermedad infecciosa*: enfermedad debida a un microorganismo que se replica en el organismo infectado.

Epidemia o Epizootía*: enfermedad que afecta bruscamente un gran número de animales a la vez.

Epidemiología*: estudio de las enfermedades y de los factores de salud en una población.

Espiráculo: En el caso de los cetáceos, corresponde a los orificios nasales que se encuentran en la parte superior de la cabeza, a través del cual respira aire de la superficie. Es homólogo con la fosa nasal de otros mamíferos.

***Feresa attenuata*:** orca pigmea (pygmy killer whale)

Filogenia o filogenética: parte de la biología que estudia el origen y desarrollo evolutivo de los organismos. Mediante árboles filogenéticos representa gráficamente las relaciones genéticas y la evolución de los distintos organismos.

***Globicephala macrorhynchus*:** calderón tropical (short-finned pilot whale)

***Globicephala melas*:** calderón común (long-finned pilot whale)

***Grampus griseus*:** calderón gris o delfín de Risso (Risso's dolphin)

grupo externo o “outgroup”: secuencia utilizada en los árboles no enraizados (como los construidos con el algoritmo Neighbor Joining), y que permite enraizar el árbol debido a su lejanía en comparación con las otras secuencias incluidas en el árbol filogenético.

Inmunidad*: consecuencia de la inmunización, que es el fenómeno biológico natural o inducido (por un suero o una vacuna) que permite al organismo inmunizado hacer frente a la infección por el antígeno correspondiente.

***Kogia breviceps*:** cachalote pigmeo (pygmy sperm whale)

***Kogia sima*:** cachalote enano (dwarf sperm whales)

***Lagenorhynchus acutus*:** delfín del Atlántico de flancos blancos (atlantic white-sided dolphin)

***Lagenorhynchus albirostris*:** delfín de hocico blanco (white-beaked dolphin)

***Lagenorhynchus obliquidens*:** delfín del Pacífico de flancos blancos (pacific white-sided dolphin)

***Lagenorhynchus obscurus*:** delfín oscuro (dusky dolphin)

Macaronesia: comprende cinco archipiélagos: Azores, Canarias, Cabo Verde, Madeira e Islas Salvajes.

***Megaptera novaengliae*:** ballena jorobada (humpback whale)

***Mesoplodon densirostris*:** zifio de Blainville (Blainville's beaked whale)

***Mesoplodon stejnegeri*:** Zifio de Stejneger o zifio del mar de Bering (Stejneger's beaked whale)

***Monachus monachus*:** foca monje del Mediterráneo (mediterranean monk seal)

***Monodon monoceros*:** narval (narwhal)

***Orcinus orca*:** orca (killer whale)

Parásito*: ser vivo dependiente de su hospedador.

Patógeno: Un patógeno o agente biológico patógeno es aquel elemento o medio capaz de producir algún tipo de enfermedad o daño en el cuerpo de un animal, un ser humano o un vegetal, cuyas condiciones estén predispuestas a las ocasiones mencionadas.

PCR: polimerase chain reaction, amplificación en cadena por polimerasa. La PCR está basada en el empleo de unos cebadores, secuencias cortas de oligonucleótidos complementarios a una región del genoma que se desea amplificar y que, mediante su unión, delimitan el fragmento de interés.

Pelágico: El piélago (del griego πέλαγος (pélagos), "mar abierto") es la parte del océano que está sobre la zona pelágica, o sea, la columna de agua del océano que no está sobre la plataforma continental. Los organismos que habitan esta área se denominan pelágicos.

***Peponocephala electra* :** delfín de cabeza de melón (melón headed whale)

***Physeter macrocephalus*:** cachalote (sperm whale)

***Phoca vitulina*:** foca común (harbour seal)

***Phocoena phocoena*:** marsopa común (harbour porpoise)

***Phocoena spinipinnis*:** marsopa espinosa (Burmeister's porpoise)

Pleomórfico: de forma variable

Población*: grupo de individuos de una misma especie

Proteínas integrales: canales (generalmente glicoproteínas) que actúan como poros por los que determinadas sustancias pueden entrar o salir de la célula

Proteína estructural viral: es una proteína viral que es un componente estructural del virus maduro

***Pseudorca crassidens*:** falsa orca (false killer whale)

Reservorio*: especie (s), medio (s) o mecanismo (s) que permiten la supervivencia de un agente patógeno considerado como especie.

Retrotranscripción, transcripción inversa o transcripción reversa: Proceso que implica la generación de una cadena ADN complementario de cadena simple, a partir de un ARN de cadena simple.

Secuenciación: conjunto de técnicas empleadas para determinar el orden de nucleótidos en un fragmento de ADN.

Serología*: técnica de detección de anticuerpos en el suero de un individuo.

Sotalia guianensis: delfín costero (guiana dolphin)

Stenella coeruleoalba: delfín listado (striped dolphin)

Steno bredanensis: delfín de dientes rugosos (rough-toothed dolphin)

Taxonomía*: la teoría y la práctica de la descripción, de la denominación y de la clasificación de los seres vivos.

Tursiops aduncus: delfín indo-pacífico (spotted bottlenose dolphin)

Tursiops truncatus: delfín mular (bottlenose dolphin)

UTR: Untranslated sequence, secuencia no traducida de un gen.

Venérea: sexual

Vector*: todo lo que permite el transporte y / o la transmisión de un agente patógeno.

Virulencia*: aptitud de un agente patógeno a multiplicarse en un organismo y producirle lesiones.

Virus*: entidad biológica sub-celular, sub-microscópica, compuesta de ácido nucleico (ADN o ARN) y de proteínas. Este material genético es replicable en el interior de las células vivas. Los virus son capaces de transmitirse de una célula a otra célula. Son infecciosos de forma autónoma.

Ziphius cavirostris: zifio de Cuvier (Cuvier's beaked whale)

PROTOCOLOS DE LABORATORIO

I. Protocolo 1. Extracción de ARN por el método de trizol-cloroformo-isopropanol.

Usado en los artículos 1, 2 y 3 para el diagnóstico molecular de CeMV.

PREPARACION DE LA MUESTRA

Pesar 0,5 g de tejido y macerarlo en 4,5 mL de PBS estéril.

Centrifugación a 2500 rpm 15 min.

Recoger el sobrenadante y alícuotarlo en eppendorfs.

Congelar a -80°C o extraer el ARN inmediatamente

EXTRACCIÓN DE ARN CON EL REACTIVO TRIPURE®

1. Preparación de todo el material necesario y agitación de las muestras en vórtex.
 2. Añadir 100 µL/eppendorf de muestra.
 3. Añadir 900 µL/eppendorf de reactivo Tripure®. Tapar y agitación de las muestras en vórtex. Incubar 5 min a temperatura (Tª) ambiente. Dar un pulso de centrifuga para eliminar restos en la tapa.
 4. Añadir 200 µL/eppendorf de cloroformo. Agitar en vortex 15 s. Incubar 10 min a Tª ambiente agitando varias veces.
 5. Centrifugar a 4°C, 10000 rpm, 15 min.
 6. Añadir 500 µL a otros tubos eppendorf de isopropanol
 7. Recoger la fase superior, con cuidado de no arrastrar la interfase, y pasar la fase superior al tubo con isopropanol. Mezclar bien por inversión. Incubar 10 min a Tª ambiente.
 8. Centrifugar a 4°C, 13000 rpm, 10 min
 9. Retirar el sobrenadante con cuidado de no arrastrar el pellet
 10. Lavar el pellet con 500 µL de etanol al 75 % frío. Agitar ligeramente, invertir los tubos para lavar las paredes.
 11. Centrifugar a 4°C, 13000 rpm, 5 min (poniendo los tubos en la misma orientación que en la centrifugación anterior).
 12. Retirar el sobrenadante con cuidado de no arrastrar el pellet pero tratando de eliminar todo el etanol.
 13. Secar a Tª ambiente hasta que no queden restos de etanol (aproximadamente 10 min)
 14. Resuspender en 10 µL de agua estéril, agitar en vórtex evitando dejar gotas en las paredes.
 15. Guardar a -70°C hasta su uso (o a 4°C si se va a emplear en 1-2 horas desde su obtención).
-

II. Protocolo 2. Extracción de ADN con un kit comercial de Roche®

Usado en los artículos 3 y 4 para el diagnóstico molecular de HV.

PREPARACION DE LA MUESTRA

Pesar 0,5 g de tejido y macerarlo en 4,5 mL de PBS estéril.

Centrifugación a 2500 rpm 15 min.

Recoger el sobrenadante y alícuotarlo en eppendorfs.

Congelar a -20°C o extraer el ADN en las dos horas siguientes

EXTRACCIÓN DE ADN MEDIANTE EL KIT “HIGH PURE TEMPLATE PREPARATION MIX - DNA BOEHRINGER” DE ROCHE®

En un eppendorf añadir:

1. 200 µL de binding buffer
 2. 40 µL de proteinasa K (PK) (conservar la PK a -20°C)
 3. 200 µL de muestra problema
 4. Dar un pulso de centrifuga
 5. Incubar a 72°C, 10 min (en este momento también poner a 70°C el agua empleada para la elusión).
 6. Dar un pulso de centrifuga
 7. 100 µL de isopropanol
 8. Vórtex suave. Pasar todo el contenido de los eppendorf a las columnas (volcar o pipeta)
 9. Centrifugar a 8000 rpm, 1 min. Tirar tubo de abajo.
 10. 500 µL de Inh Renoval Buffer
 11. Centrifugar a 8000 rpm, 1 min. Tirar tubo de abajo
 12. 450 µL de Wash Buffer
 13. Centrifugar a 8000 rpm, 1 min. Tirar tubo de abajo
 14. 450 µL de Wash Buffer
 15. Centrifugar a 8000 rpm, 1 min. Tirar tubo de abajo
 16. Centrifugar sobre el tubo vacío a 13000 rpm, 10 s. Tirar tubo de abajo y poner un eppendorf en su lugar.
 17. 30 µL de agua estéril a 70 °C
 18. Centrifugar a 8000 rpm, 1 min
 19. Guardar a -20 °C
-

III. Protocolo 3. Protocolo de la RT-PCR para la detección del gen de la fosfoproteína de morbillivirus

Usado en el artículos 1 y 2 para el diagnóstico molecular de CeMV.

DETECCIÓN DE MORBILLIVIRUS MEDIANTE UNA RT-PCR QUE AMPLIFICA EL GEN DE LA FOSFOPROTEINA

Adaptación a nuestro laboratorio del protocolo de Yang et al. (2006). Los cebadores son de Barrett et al. (1993).

Cebadores:

DMV-C: 5'-ATG TTT ATG ATC ACA GCG GT-3'

DMV-P2: 5'-ATT GGG TTG CAC CAC TTG TC-3'

REACTIVOS	VOLUMEN (21 µL de reacción / muestra)	CONCENTRACIÓN FINAL
Buffer 10x	2,5 µL	1x
Cl ₂ Mg 25mM	2,5 µL	2,5 mM
dNTPs 10mM	0,5 µL	0,2 mM
Inh RNAsas 20U/µL	0,25 µL	5 U
RTasa 100U/µL	0,125 µL	12,5 U
Fast start 5U/µL	0,25 µL	1,25 U
DMV-C 20µM	0,625 µL	0,5 µM
DMV-P2 20µM	0,625 µL	0,5 µM
H ₂ O	13,625 µL	

Se añade 4 µL de ARN molde obtenido de la extracción por el método de trizol-cloroformo-isopropanol (Protocolo 1).

Es una RT-PCR en un paso cuyo programa de termociclador es:

30 min 50°C, 4 min 94°C; 45x (1 min 94°C, 1 min 51°C, 1 min 72°C), 7 min 72°C.

La lectura de la RT-PCR se hace en gel de agarosa al 2 %. El fragmento esperado es de 429 pb.

IV. Protocolo 4. Protocolo de la RT-PCR para la detección del gen de la proteína de fusión de CeMV

Usado en los artículos 2 y 3 para el diagnóstico molecular de CeMV.

DETECCIÓN DE CeMV MEDIANTE UNA RT-PCR QUE AMPLIFICA EL GEN DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN

PCR desarrollada en nuestro laboratorio (Bellière, 2008; Artículo 3, 2010).

Cebadores:

CeMVFu-F: 5'-GGC ACC ATA ATT AGC CAG GA-3'

CeMVFu-R: 5'-GCC CAG ATT TGT GCC TAC AT-3'

REACTIVOS	VOLUMEN (23 µL de reacción / muestra)	CONCENTRACIÓN FINAL
Buffer 10x	2,5 µL	1x
Cl ₂ Mg 25mM	2,5 µL	2,5 mM
dNTPs 10mM	0,5 µL	0,2 mM
Inh RNAsas 20U/µL	0,25 µL	5 U
RTasa 100U/µL	0,125 µL	12,5 U
Fast start 5U/µL	0,25 µL	1,25 U
CeMVFu-F 20µM	0,125 µL	0,1 µM
CeMVFu-R 20µM	0,125 µL	0,1 µM
H ₂ O	16,625 µL	

Se añade 2 µL de ARN molde obtenido de la extracción por el método de trizol-cloroformo-isopropanol (Protocolo 1).

Es una RT-PCR en un paso cuyo programa de termociclador es:

30 min 48°C, 4 min 95°C; 40x (30 s 94°C, 30s 55°C, 30 s 72°C), 7 min 72°C.

La lectura de la RT-PCR se hace en gel de agarosa al 2 % y el fragmento esperado es de 192 pb.

V. Protocolo 5. Protocolo de la PCR para la detección del gen de la DNA polimerasa de HV

Usado en los artículos 3 y 4 para el diagnóstico molecular de HV.

DETECCIÓN DE HV MEDIANTE UNA PCR QUE AMPLIFICA EL GEN DE LA ADN POLIMERASA

Adaptación a nuestro laboratorio del protocolo de VanDevanter et al. (1996). PCR anidada con dos cebadores contracorriente en la PCR externa.

Cebadores externos:

DFA: 5'-GAY TTY GCN AGY YTN TAY CC-3'

ILK: 5'-TCC TGG ACA AGC AGC ARN YSG CNM TNA A-3'

KG1: 5'-GTC TTG CTC ACC AGN TCN ACN CCY TT-3'

Cebadores internos:

TGV: 5'-TGT AAC TCG GTG TAY GGN TTY ACN GGN GT-3'

TYG: 5'-CAC AGA GTC CGR TCN CCR TAD AT-3'

PCR externa:

REACTIVOS	VOLUMEN (21 µL de reacción / muestra)	CONCENTRACIÓN FINAL
Buffer 10x	2,5 µL	1x
Cl ₂ Mg 25mM	2,5 µL	2,5 mM
dNTPs 10mM	0,5 µL	0,2 mM
Fast start 5U/µL	0,25 µL	0,05 U/µL
GC-RICH solution 5x	5 µL	1x
DFA 20µM	0,5 µL	0,4 µM
ILK 20µM	0,5 µL	0,4 µM
KG1 20µM	0,5 µL	0,4 µM
H ₂ O	8,75 µL	

Se añade 4 µL de ADN molde obtenido de la extracción por el kit de Roche (Protocolo 2).

Anexos

PCR interna:

REACTIVOS	VOLUMEN (21 µL de reacción / muestra)	CONCENTRACIÓN FINAL
Buffer 10x	2,5 µL	1x
Cl ₂ Mg 25mM	2,5 µL	2,5 mM
dNTPs 10mM	0,5 µL	0,2 mM
Fast start 5U/µL	0,25 µL	0,05 U/µL
GC-RICH solution 5x	5 µL	1x
TGV 20µM	0,5 µL	0,4 µM
IYG 20µM	0,5 µL	0,4 µM
H ₂ O	9,75 µL	

Se añade 4 µL de ADN molde obtenido de la PCR externa.

El programa de termociclador para ambas PCRs es:

5 min 94°C; 45x (30 s 94°C, 1 min 46°C, 1 min 72°C), 7 min 72°C.

La lectura de la PCR se hace en gel de agarosa al 2 % y el fragmento esperado es de 220 pb.

VI. Protocolo 6. Producción de ADN complementario (cDNA) a partir de ARN para posterior clonaje del genoma de CeMV

Usado en el artículo 2 para la caracterización molecular de DMV de 2007.

PROTOCOLO DE RETROTRANSCRIPCIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE cDNA A PARTIR DE ARN de CeMV PREVIAMENTE AL CLONAJE.

Kit comercial RT Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, Roche ®.

Cebador:

DMV-2: 5'-ATH CCC AGC TTT GTC TGG T-3'

REACTIVOS	VOLUMEN (20 µL de reacción / muestra)	CONCENTRACIÓN FINAL
Buffer 5x	4 µL	1x
dNTPs	2 µL	0,2 mM
Inh RNAsas	0,5 µL	2,5 U/reacción
RTasa	0,5 µL	0,4 µM
DMV2 20µM	2,5 µL	2,5 µM

Se añade 10,5 µL de ARN molde obtenido de la extracción por el método de trizol-cloroformo-isopropanol (Protocolo 1).

El programa para la retrotranscripción es:

RT: 60 min 50°C, Desnaturalización: 5 min 85°C

VII. Protocolo 7. Protocolo de la PCR para la amplificación del gen de la polimerasa de HV con una polimerasa de alta fidelidad para posterior clonaje

Usado en el artículo 3, el producto amplificado con polimerasa de alta fidelidad se clona en plásmido de E. coli.

AMPLIFICACIÓN DEL GEN DE LA ADN POLIMERASA DE HV CON EL USO DE UNA POLIMERASA DE ALTA FIDELIDAD PREVIAMENTE AL CLONAJE

Adaptación a nuestro laboratorio del protocolo de VanDevanter et al. (1996). PCR anidada con dos cebadores contracorriente en la PCR externa.

Cebadores externos:

DFA: 5'-GAY TTY GCN AGY YTN TAY CC-3'

ILK: 5'-TCC TGG ACA AGC AGC ARN YSG CNM TNA A-3'

KG1: 5'-GTC TTG CTC ACC AGN TCN ACN CCY TT-3'

Cebadores internos:

TGV: 5'-TGT AAC TCG GTG TAY GGN TTY ACN GGN GT-3'

TYG: 5'-CAC AGA GTC CGR TCN CCR TAD AT-3'

PCR externa:

REACTIVOS	VOLUMEN (23 µL de reacción / muestra)	CONCENTRACIÓN FINAL
Buffer 5x	5 µL	1,5 mM
dNTPs 10mM	0,5 µL	200 µM
Expand High Fidelity PLUS Enzyme Blend (5U/µL)	0,25 µL	2,5 U/reacción
DFA 20µM	0,5 µL	0,4 µM
ILK 20µM	0,5 µL	0,4 µM
KG1 20µM	0,5 µL	0,4 µM
H ₂ O	15,75 µL	

Se añade 2 µL de ADN molde obtenido de la extracción por el kit de Roche (Protocolo 2), de una muestra ya diagnosticada como positiva, y de la cual se quiere hacer el clonaje.

PCR interna:

REACTIVOS	VOLUMEN (21 μ L de reacción / muestra)	CONCENTRACIÓN FINAL
Buffer 5x	5 μ L	1,5 mM
dNTPs 10mM	0,5 μ L	0,2 mM
Expand High Fidelity PLUS Enzyme Blend (5U/ μ L)	0,25 μ L	2,5 U/reacción
TGV 20 μ M	0,5 μ L	0,4 μ M
IYG 20 μ M	0,5 μ L	0,4 μ M
H ₂ O	16,25 μ L	

Se añade 2 μ L de ADN molde obtenido de la PCR externa.

El programa de termociclador para ambas PCRs es:

2 min 94°C; 45x (20 s 94°C, 30 s 46°C, 1 min 72°C), 7 min 72°C.

La lectura de la PCR se hace en gel de agarosa al 2 % y el fragmento esperado es de 220 pb.

VIII. Protocolo 8. Clonaje. Incluye Anexo I, Protocolo, Anexo II y Anexo III

Usado en los artículos 2 y 3, en el 2 para la caracterización molecular de DMV de 2007, y en el 3, para la caracterización molecular de las secuencias de HV halladas.

ANEXO I, PCR Clean-Up System

*Preparar la Membrane Wash Solution:

Membrane Wash Solution : añadir 75 mL de etanol al 95%. Marcar botella.
190 mL agua miliQ + 10 mL de etOH al 100%

DESDE PRODUCTO DE PCR

1. Amplificación del ADN diana (Protocolo 7 en el caso de HV)
2. Añadir el mismo volumen de Membrane Binding Solution al producto de reacción de PCR
3. Purificación del ADN con microcentrífuga.

PURIFICACIÓN DEL ADN CON MICROCENTRÍFUGA

1. Poner una SV minicolumna en un tubo colector para cada muestra.
2. Transferir el preparado del producto de PCR al ensamblaje de SV Minicolumn e incubar 1 min a Tª ambiente.
3. Centrifugar a 14 000 rpm, 1 min. Tirar el líquido del tubo colector. Volver a poner la columna en el tubo colector.
4. Añadir 700 µL de Membrane Wash Solution a la columna. Centrifugar 14 000 rpm, 1 min. Tirar el contenido del tubo colector y volver a poner la columna en el tubo colector. Añadir 500 µL de Membrane Wash Solution a la columna y centrifugar 14 000 rpm, 6 min.
5. Tirar el contenido del tubo colector. Centrifugar 1 min con el tapón abierto para permitir la evaporación del etanol residual.
6. Transferir la columna a un eppendorf de 1,5 mL limpio. Añadir 30 µL de agua libre de nucleasas al centro de la columna sin tocar la membrana. Incubar a Tª ambiente 1 min. Centrifugar 1 min a 14 000 rpm.
7. Tirar la columna y conservar el eppendorf que contiene el ADN a 4°C para una utilización en las 1-2 horas posteriores, o a -20°C.

PROTOCOLO CLONAJE PROMEGA®

pGEM®-T Easy Vector System II

todos los reactivos a -20°C y las células JM109 a -70°C

I. Producto de PCR

- 1) Hacer la PCR con una ADN polimerasa de alta fidelidad. Para ARN, partir del cDNA.
- 2) Una alícuota del producto de PCR se analiza en un gel de agarosa al 1% antes de su uso. El producto de PCR se purificará con "PCR Clean-Up System" (anexo I).
- 3) Para optimizar la eficacia del clonaje, la cantidad de ADN se ajustará dependiendo de la concentración del producto de PCR. (Cuando las concentraciones molares son altas, menores volúmenes de fragmentos de PCR son necesarios para la reacción de ligación).

$$\frac{\text{ng de vector} \times \text{tamaño en kb del injerto}}{\text{tamaño en kb del vector}} \times (\text{ratio molar del injerto:vector}) = \text{ng de injerto}$$

$$\text{Ej.: } \frac{50\text{ng vector} \times 0,5 \text{ kb injerto}}{3,0 \text{ kb vector}} \times \frac{1}{1} = 8,3 \text{ ng de un injerto de } 0,5 \text{ kb}$$

El clonaje está optimizado para un ratio insert:vector de 1:1, sin embargo funciona desde ratios de 8:1 a 1:8.

II. Protocolo para la ligación del plásmido y el 2X Rapid Ligation Buffer

- 1) Hacer alícuotas de 50 µL del 2X Rapid Ligation Buffer. Conservarlos a -20°C.
- 2) Centrifugar brevemente los tubos del pGEM-T Easy vector y del Control Insert DNA para recolectar su contenido al fondo del tubo.
- 3) Usar tubos de 0,2 mL de PCR.
- 4) Vortear vigorosamente el tubo de 2X Rapid Ligation Buffer antes de cada uso.

	Reacción estándar	Control positivo	Control negativo	Mix (x3)
2X Rapid ligation buffer, T4 DNA ligase	5 µL	5 µL	5 µL	15 µL
pGEM-T easy vector (50ng)	1 µL	1 µL	1 µL	3 µL
T4 DNA ligase	1 µL	1 µL	1 µL	3 µL
Agua	1 µL	1 µL	1 µL	3 µL
PCR product	2 µL	-	-	
Control insert DNA 4ng/ µl	-	2 µL	-	
Agua	-	-	2 µL	
Total	10 µL	10µL	10µL	

- 5) Mezclar las reacciones pipeteando. Incubar las reacciones 1 h a Tª ambiente o toda la noche a 4°C para un máximo número de transformantes.

III. Protocolo para las transformaciones

- 1) Preparar al menos seis placas LB (Luria Bertani)/ampicilina/IPTG/X-Gal (dos para cada reacción de ligadura) (ver anexo II) así como medio LB y ampicilina para el aislamiento del plásmido (ver anexo III)
- 2) Baño a 42°C y estufa a 37°C.
- 3) Atemperar SOC a Tª ambiente
- 4) Centrifugar los tubos de la reacción de ligadura para que el contenido vaya al fondo. Añadir 2µL de cada reacción de ligadura a un eppendorf estéril de 1,5 mL en hielo.
- 5) Sacar el tubo de las células JM109 del congelador y ponerlas en un baño de hielo justo antes de descongelarlas (5 min). Mover el vial suavemente.
¡Debido a la extrema fragilidad de las células JM109, es importante evitar un pipeteo excesivo!
- 6) Transferir **cuidadosamente** 50µL de células en cada uno de los eppendorfs de la reacción de ligadura del punto 4 (solamente 10-15 µL para los controles negativos y positivos).
- 7) **Suavemente** remover los tubos y ponerlos en hielo 20 min.
- 8) Choque térmico de las células 45-50 s en un baño de agua a 42°C exactos. (**no remover**).
- 9) Inmediatamente poner los tubos en hielo 2 min
- 10) Añadir 950 µL de medio SOC a temperatura ambiente
- 11) Incubar 1,5 horas a 37°C con movimiento (~ 150 rpm)

12) Centrifugar 3000 rpm (1000 g) durante 10 min, y resuspender el pellet en 200 μ L de medio SOC, y sembrar 100 μ L en placas de petri LB/ampicilina/IPTG/X-Gal por duplicado.

13) Incubar las placas toda la noche (16-24 horas) a 37°C. Si se siembran 100 μ L, crecen aproximadamente 100 colonias por placa. Largas incubaciones o almacenamiento de las placas a 4°C (después de la incubación toda la noche a 37°C) puede usarse para facilitar el desarrollo del color azul. Las colonias blancas generalmente contienen el inserto, pero las colonias azules también lo pueden tener.

IV. Aislamiento del plásmido

Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System A1330 → Anexo III

ANEXO II: PREPARACIÓN DE 30 PLACAS LB (Luria Bertani)/ampicilina/IPTG/X-Gal

1. Solución de stock de IPTG (0,1M), 4°C
Añadir 41,7 mL de agua miliQ al bote de 1 g de IPTG.
2. X-Gal (2ml) 50mg/mL
3. Medio LB/agar/ampicilina:
Añadir 25 g de LB por litro de agua destilada y 15g de agar.
Autoclavar a 121°C durante 15 min.
Enfriar hasta 50-55°C
Añadir 1 mL de ampicilina al 100mg/mL.
5 mL de IPTG
1,6 ml de X-gal

Poner 30-35 mL de medio en placas de Petri de 85 mm de diámetro.
Dejar el agar endurecer.

Guardar a 4°C durante 1 mes.

ANEXO III : Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System

Antes de usar el kit:

Column Wash Solution: añadir 35ml de etanol al 95%

Preparación de las E. coli:

1. Utilizar una única colonia bien aislada de la placa de medio LB (Luria-Bertani) e inocularla en un matraz que contenga 3 mL de LB con ampicilina.
2. Incubar toda la noche (12-16 horas) a 37°C en un incubador agitador.

Preparación de la lisis de las bacterias:

1. Recolectar el total del volumen de cada muestra en **2 eppendorfs** de 1,5 mL:
tubo a. 1 **eppendorf**: centrifugar a 3000 rpm, 10 min. Tirar el sobrenadante y congelar en criotubo con medio de congelación de bacterias.
tubo b. 1 **eppendorf**: centrifugar a 11500 rpm (10000g), 5 min. Tirar el sobrenadante y dar la vuelta al tubo para secar la enbocadura en un papel de filtro.
2. En el tubo b, añadir 250 μ L de "Cell Resuspension Solution (CRA)" y resuspender totalmente el pellet vorteoando o pipeteando. **Es esencial resuspender exhaustivamente las células.**
A partir de ahora, no vortear, mezclar únicamente invirtiendo los tubos.
3. Añadir 250 μ L de "Cell lysis solution (CLA)" y mezclar invirtiendo 4 veces los tubos.
Incubar a Tª ambiente hasta que la suspensión de células se aclare. **Máx 5 min.**
4. Añadir 10 μ L de "Alkaline Protease Solution" y mezclar invirtiendo los tubos. Incubar **5 min** a Tª ambiente.

5. Añadir 350µL de "Neutralization solution (NSB)" e inmediatamente mezclar invirtiendo los tubos 4 veces.
6. Centrifugar el lisado de bacterias a la velocidad máxima de 13500 rpm (14000g), 10 min, T^a ambiente.

Aislamiento del plásmido con el injerto de ADN y purificación: para cada muestra insertar una columna en un tubo colector.

- 1) Transferir el sobrenadante (SN) (aproximadamente 850 µL) a una columna preparada por decantación. Evitar transferir el precipitado blanco con el sobrenadante.
 - 2) Centrifugar el SN a 14000 rpm, 1 min, a T^a ambiente. Tirar el contenido del tubo colector. Volver a montar la columna.
 - 3) Añadir 750 µL de "Column Wash Solution (CWA)"
 - 4) Centrifugar a 14000 rpm, 1 min, T^a ambiente. Tirar el contenido del tubo colector. Volver a montar la columna.
 - 5) 250 µL de CWA
 - 6) Centrifugar a 14000 rpm, 2 min, T^a ambiente.
 - 7) Transferir la columna a un eppendorf nuevo y estéril de 1,5 mL, teniendo cuidado de no transferir con la columna ningún resto de CWA. Si queda CWA, volver a centrifugar otro minuto.
 - 8) Transferir la columna a un eppendorf nuevo y estéril.
 - 9) Eluir el ADN plasmídico añadiendo 40 µL de agua libre de nucleasas a la columna. Incubar 1 min a T^a ambiente y centrifugar a 14000 rpm, 1 min.
 - 10) Después de eluir el ADN, tirar la columna.
 - 11) Cerrar el eppendorf y conservarlo a -20°C.
-

IX Protocolo 9. Protocolo de la RT-PCR de CeMV que emplea los cebadores M3 y CeMV-F52

Esta PCR no se ha publicado en ninguno de los artículos presentados en esta tesis (referida en el apartado V.I.3 de la Discusión).

AMPLIFICACIÓN DE UNA REGIÓN DE CeMV POSIBLEMENTE ESPECIE-ESPECIFICA: región comprendida entre el final del gen de la proteína de matriz y el principio del gen de la proteína de fusión.

Cebadores:

M3 : 5'- CAC AGA TCC TCT CCT CG-3' (Bolt et al. 1994)

CeMV-F52: 5'-CAA TGG ATT TGC CCT TCA GT-3' (diseñado en nuestro laboratorio)

REACTIVOS	VOLUMEN (21 µL de reacción / muestra)	CONCENTRACIÓN FINAL
Buffer 10x	2,5 µL	1x
Cl ₂ Mg 25mM	2,5 µL	2,5 mM
dNTPs 10mM	1 µL	0,4 mM
Inh RNAsas 20U/µL	0,25 µL	0,2 U/µL
RTasa 100U/µL	0,125 µL	0,5 U/µL
Fast start 5U/µL	0,25 µL	0,05 U/µL
M3 20µM	0,625 µL	0,5 µM
CeMV-F52 20µM	0,625 µL	0,5 µM
H ₂ O	13,125 µL	

Se añade 4 µL de ARN molde obtenido de la extracción por el método de trizol-cloroformo-isopropanol (Protocolo 1).

Es una RT-PCR en un paso cuyo programa de termociclador es:

45 min 50°C, 4 min 94°C; 45x (1 min 94°C, 1 min 48°C, 1 min 72°C), 7 min 72°C.

La lectura de la RT-PCR se hace en gel de agarosa al 2 % y el fragmento esperado es de 584 pb.

